

UCH-FC

DOC-B

N218

C 1

CONDUCCION IONICA Y PROPIEDADES CINETICAS DEL CANAL
DE SODIO DE MUSCULO ESQUELETICO DE ANFIBIO
MODIFICADO POR BATRACOTOXINA.

Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología.

FACULTAD DE CIENCIAS

por

David Olivier Naranjo Donoso

Santiago, Enero de 1991

Profesores guía : Dr. Osvaldo Alvarez
Dr. Ramón Latorre.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado del candidato

David Olivier Naranjo Donoso

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de defensa de Tesis rendido en Enero de 1991.

Patrocinantes de Tesis:

Dr. Osvaldo Alvarez.

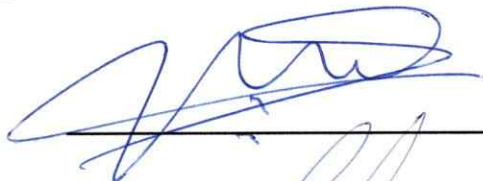


Dr. Ramón Latorre.



Comisión Informante de Tesis:

Dr. Gonzalo Bustos



Prof. Enrique Jaimovich



Dr. Pedro Labarca



Dr. Andrés Stutzin



...a Sara, Laura y también a Patricia

AGRADECIMIENTOS

Fui afortunado al caer en este laboratorio

Mi gratitud a Osvaldo Alvarez y a Ramón Latorre; mis maestros.

A Ximena Cecchi y a Nataniel Malebrán, por su cariño y su ejemplo.

A Juan Espinoza, a Juan Valencia y a Anita Godoy, por su compañerismo.

A mis compañeros de sufrimiento durante mi larga temporada en este laboratorio; los del comienzo: Andrés Oberhauser, Enrique Estrada, Ricardo Delgado, Carmen Alcayaga y Alfredo Villarroel. Y Marco Antonio Díaz, Bernardo Morales, Patricia Hidalgo, Felipe Díaz, Heidi Montesino y Sebastián Candia, los del final. De todos ellos llevo algo.

Agradezco a Pedro Labarca, a Lizi Behrens, a Daniel Wolff, a Benjamín Suárez, a Cecilia Vergara, a Juan Bacigalupo, por su amistad y una visión más amplia de la Biología.

A Luisa Soto y Marcelo Rojas por supuesto.

Esta tesis también le debe velas a santos de otras partes. Los santos son: Cecilia Hidalgo y Enrique Jaimovich por abrirme las puertas de su laboratorio y por su constante interés en mi trabajo, Marcia Cortés, Ximena Sánchez, Fernando Mieres y Miguel Angel por su ayuda desinteresada a la hora de entrar en la cámara fría.

Deseo agradecer al CECS por el apoyo financiero que me brindó durante estos últimos dos años. Este apoyo dignificó mi trabajo de laboratorio.

Finalmente, a Patricia por que esta Tesis también es de ella.

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	xvii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xxii
1.- INTRODUCCION	1
1.1 Los canales iónicos son proteínas	2
1.2 Conducción y cinética de los canales iónicos	4
1.2.1 Conducción iónica	4
1.2.1.1 <i>Modelos de barreras de energía</i>	5
1.2.1.2 <i>Ocupación múltiple en canales iónicos</i>	6
1.2.1.3 <i>Potencial de superficie en canales iónicos</i>	7
1.2.2 Cinética	7
1.2.2.1 <i>Descripción Clásica</i>	7
1.2.2.2 <i>Los procesos de apertura y de inactivación de los canales de sodio están acoplados</i>	10

1.3	Antecedentes específicos de este trabajo	11
1.3.1	El canal de sodio puede ser ocupado por más de un ion a la vez	11
1.3.2	La BTX modifica funcionalmente a los canales de sodio	11
1.3.3	Conducción iónica en el canal de sodio modificado por BTX	12
1.3.4	Propiedades cinéticas del canal de sodio modificado por BTX	14
1.5	Objetivos	16
1.5.1	¿ Porqué <i>Caudiververa caudiververa</i> ?	17
1.5.2	¿ Porqué las bicapas ?	17
2.-	METODOS	19
2.1	Obtención de membranas de túbulos transversales	19
2.2	Montaje Experimental y formación de bicapas	20
2.3	Protocolos de incorporación	21
2.3.1	Protocolos diseñados para medir la conductancia de los canales a distintas concentraciones de sodio	22
2.3.1.1	<i>Experimentos en altas concentraciones de sodio (1-3 M)</i>	22
2.3.1.2	<i>Experimentos en concentraciones intermedias de sodio (0,2-0,5 M)</i>	22
2.3.1.3	<i>Experimentos en concentraciones bajas de sodio (2,2-60 mM)</i>	22
2.3.1.4	<i>Experimentos en concentraciones muy bajas de sodio (0,4-1 mM)</i>	23
2.3.2	Protocolos diseñados para medir la selectividad a cationes alcalinos	23
2.3.3	Protocolos diseñados para determinar el efecto de la fracción molar Na-Li sobre la conducción	24
2.3.3.1	<i>Determinación de la conductancia cuando f es cercana a 1</i>	24
2.3.3.2	<i>Determinación de la conductancia cuando f es cercana a 0</i>	24
2.4	Protocolos de voltajes y orientación de los canales incorporados	24
2.4.1	Experimentos de conducción	24
2.4.2	Experimentos de cinética	25

2.4.3	Orientación de los canales incorporados	26
2.5	Análisis de resultados experimentales	26
2.5.1	Conducción iónica	26
2.5.1.1	<i>Obtención de curvas I-V y cálculo de conductancias</i>	26
2.5.1.2	<i>Ajuste de curvas</i>	27
2.5.1.3	<i>Modelo de barreras de energía</i>	27
2.5.1.3.1	<i>Modelos de barreras con ocupación múltiple</i>	29
2.5.1.3.2	<i>Modelos de barreras y potencial de superficie</i>	30
2.5.1.3.3	<i>Cálculo de la actividad iónica de las sales de cloruro</i>	30
2.5.1.3.4	<i>Elección de las características básicas del modelo de barreras</i>	32
2.5.1.4	<i>Isoterma de inhibición y carga superficial</i>	35
2.5.2	Cinética	37
2.5.2.1	<i>Distribución de tiempos de permanencia</i>	39
2.5.2.2	<i>Ajuste de distribuciones de tiempos de permanencia</i>	40
2.5.2.3	<i>Estudios de correlación entre duraciones de eventos abiertos y cerrados adyacentes</i>	41
2.5.2.4	<i>Selección de modelos y determinación de las constantes cinéticas</i>	42
2.5.2.5	<i>Generación de registros de corriente simulados a partir de los modelos propuestos</i>	44
2.5.2.6	<i>Construcción de histogramas de eventos simulados</i>	45
2.5.2.7	<i>Selección de modelos</i>	45
3.-	RESULTADOS	46
3.1	Los canales de sodio obtenidos de las preparaciones hechas en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas muestran distinta conductancia, pero características cinéticas similares	46

3.1.1	Canales obtenidos de preparaciones hechas en ausencia de inhibidores de proteasas	46
3.1.2	Canales obtenidos de preparaciones hechas en presencia de inhibidores de proteasas	53
3.1.3	La cinética de los canales de ambas preparaciones es dependiente del voltaje	53
3.2	Sistema de conducción del canal de sodio modificado por BTX	57
3.2.1	Los canales de sodio de músculo esquelético de rana muestran subestados de conductancia	57
3.2.1.1	<i>Los canales de la preparación hecha en la ausencia de inhibidores de proteasas muestran un subestado de mayor conductancia</i>	59
3.2.1.2	<i>Los canales de la preparación hecha en la presencia de inhibidores de proteasas muestran un subestado de menor conductancia</i>	62
3.2.2	Curva conductancia vs. [Na] de los canales de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas	65
3.2.2.1	<i>A bajas concentraciones de sodio el subestado γ_1 se observa con mayor frecuencia</i>	66
3.2.3	A bajas concentraciones de sodio, las relaciones corriente-voltaje son sublineales	72
3.2.3.1	<i>Canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas</i>	72
3.2.3.2	<i>Canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas</i>	73
3.2.3.3	<i>La razón de conductancia g_1/g_2 es constante en el intervalo 2 - 3000 mM</i>	77
3.2.4	La relación entre la conductancia y la concentración de sodio de los estados más conductores de ambas preparaciones son iguales	77
3.2.5	γ_1 y γ_2 tienen la misma razón de permeabilidades P_L/P_{Na} y P_{Cs}/P_{Na}	81

3.2.6	Modelo de barreras de energía	85
3.2.6.1	<i>El mejor ajuste de las relaciones conductancia vs. $[Na^+]$ se obtiene con modelos de barreras que incorporan ocupación doble y la presencia de cargas negativas en la superficie del canal</i>	88
3.2.6.2	<i>Ajuste de las relaciones corriente-voltaje</i>	90
3.2.7	Predicciones del modelo de barreras	92
3.2.7.1	<i>El bloqueo a bajas concentraciones de Na^+ no es explicado por una simple isoterma de inhibición</i>	93
3.2.7.2	<i>El canal de sodio permite ocupación múltiple</i>	96
3.3	Características cinéticas del canal de sodio modificado por BTX.	100
3.3.1	Examen de estabilidad de los registros	100
3.3.2	La cinética de los canales de sodio depende de la concentración de sodio	103
3.3.2.1	<i>Al bajar la concentración de sodio en el lado interno del canal la curva de activación se desplaza a potenciales menos negativos</i>	104
3.3.2.2	<i>Al aumentar la concentración de sodio en ambos lados del canal la curva de activación se desplaza hacia potenciales menos negativos</i>	107
3.3.3	Distribuciones de tiempos de permanencia	111
3.3.3.1	<i>Los canales de sodio modificados por BTX poseen a lo menos dos estados cinéticos abiertos</i>	111
3.3.3.2	<i>Los canales de sodio modificados por BTX poseen a lo menos tres estados cinéticos cerrados</i>	117
3.3.4	Efecto del voltaje y de la concentración de sodio sobre las distribuciones de tiempos de permanencia	117
3.3.4.1	<i>La duración de los eventos abiertos y de los cerrados depende del voltaje</i>	117
3.3.4.2	<i>Efecto del voltaje sobre las constantes de tiempo de las distribuciones</i>	121

3.3.5	Los eventos cerrados breves son acompañados de eventos abiertos largos y los eventos cerrados largos son acompañados por eventos abiertos breves	124
3.3.6	Modelos cinéticos	129
3.3.7	Ajuste de las distribuciones de tiempos de permanencia y selección de modelos	130
3.3.7.1	<i>Ajuste de las distribuciones de tiempos de permanencia con los modelos cinéticos</i>	131
3.3.7.2	<i>Selección de modelos cinéticos</i>	134
3.3.8	Constantes de cinéticas y sus dependencias del voltaje	138
3.3.9	Características cinéticas de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas	146
4.-	DISCUSION	151
4.1	Consideraciones en torno a la técnica de bicapas	151
4.2	Mecanismo de conducción iónica del canal de sodio modificado por BTX	152
4.2.1	Efecto de cargas superficiales negativas sobre la conducción iónica del canal	152
4.2.1.1	<i>Comportamiento asintótico de las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$</i>	152
4.2.1.2	<i>Bloqueo a bajas concentraciones de Na^+</i>	154
4.2.1.3	<i>Potencial de superficie en el mecanismo de conducción de otros canales Na^+ incorporados a bicapas</i>	155
4.2.2	El canal de sodio modificado por BTX presenta ocupación múltiple	155
4.2.2.1	<i>El efecto anómalo de la fracción molar y el modelo de barreras</i>	155
4.2.2.2	<i>Ocupación sencilla en otros canales de sodio modificados por BTX y el problema de las K_{ap}</i>	156
4.2.2.3	<i>Los canales modificados por BTX comparten un mecanismo de transporte común</i>	159

3.3.5	Los eventos cerrados breves son acompañados de eventos abiertos largos y los eventos cerrados largos son acompañados por eventos abiertos breves	124
3.3.6	Modelos cinéticos	129
3.3.7	Ajuste de las distribuciones de tiempos de permanencia y selección de modelos	130
3.3.7.1	<i>Ajuste de las distribuciones de tiempos de permanencia con los modelos cinéticos</i>	131
3.3.7.2	<i>Selección de modelos cinéticos</i>	134
3.3.8	Constantes de cinéticas y sus dependencias del voltaje	138
3.3.9	Características cinéticas de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas	146
4.-	DISCUSION	151
4.1	Consideraciones en torno a la técnica de bicapas	151
4.2	Mecanismo de conducción iónica del canal de sodio modificado por BTX	152
4.2.1	Efecto de cargas superficiales negativas sobre la conducción iónica del canal	152
4.2.1.1	<i>Comportamiento asintótico de las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$</i>	152
4.2.1.2	<i>Bloqueo a bajas concentraciones de Na^+</i>	154
4.2.1.3	<i>Potencial de superficie en el mecanismo de conducción de otros canales Na^+ incorporados a bicapas</i>	155
4.2.2	El canal de sodio modificado por BTX presenta ocupación múltiple	155
4.2.2.1	<i>El efecto anómalo de la fracción molar y el modelo de barreras</i>	155
4.2.2.2	<i>Ocupación sencilla en otros canales de sodio modificados por BTX y el problema de las K_{ap}</i>	156
4.2.2.3	<i>Los canales modificados por BTX comparten un mecanismo de transporte común</i>	159

4.2.2.4	<i>Comparación con el canal de sodio modificado por BTX del músculo esquelético de rata</i>	163
4.2.2.5	<i>Estado de ocupación del canal en función de $[Na^+]$</i>	165
4.2.3	Subestados de conductancia en el canal de sodio	167
4.2.3.1	<i>La frecuencia de aparición de subestados depende de la concentración de Na^+</i>	168
4.2.3.2	<i>Subestados de conductancia y modelos estructurales de los canales iónicos</i>	169
4.2.4	Efecto de la BTX sobre el mecanismo de conducción	171
4.2.4.1	<i>Efecto de la BTX sobre la selectividad iónica</i>	172
4.3	Características cinéticas del canal de sodio modificado por BTX	173
4.3.1	El canal presenta por lo menos dos estados abiertos y tres estados cerrados	173
4.3.2	La cinética del canal es afectada por el cambio de la concentración de sodio en ambos lados del canal	175
4.3.2.1	<i>Origen del desplazamiento de la curva de activación</i>	176
4.3.2.2	<i>La superficie externa está más cargada que la superficie interna</i>	181
4.3.2.2.1	<i>Cálculo de la densidad de carga en la superficie interna del canal</i>	181
4.3.2.2.2	<i>Cálculo de la densidad de carga en la superficie externa del canal</i>	182
4.3.2.2.3	<i>Las densidades de carga superficial calculadas pueden estar subestimadas</i>	183
4.3.2.3	<i>¿El potencial de superficie que modula la conducción iónica es generado por las mismas cargas que modulan la cinética?</i>	185
4.3.2.3	<i>La cinética de apertura y cierre parece ser independiente del estado de ocupación del canal</i>	186
4.3.3	Correlación inversa entre las duraciones de los eventos abiertos y cerrados adyacentes	187
4.3.4	El comportamiento cinético del canal puede ser explicado con un modelo cíclico	189
4.3.4.1	<i>Selección de modelos cinéticos</i>	189

4.3.4.2	<i>El modelo II</i>	191
4.3.4.3	<i>El modelo II puede explicar el comportamiento cinético de los canales provenientes de las preparaciones hechas en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas</i>	192
4.3.4.4	<i>Modelos cíclicos en otros canales</i>	192
4.3.4.5	<i>Reversibilidad microscópica</i>	193
4.4	Efecto de la BTX sobre los canales de sodio	195
4.4.1	Efecto de la BTX sobre la cinética del canal	196
4.4.1.1	<i>La BTX se une al estado abierto</i>	196
4.4.1.2	<i>Comparación entre el modelo II y el modelo de Tanguy y Yeh</i>	298
4.4.1.3	<i>La BTX estabiliza el estado abierto del canal</i>	200
4.4.2	Efecto de la BTX sobre la conducción y el modelo de la puerta entreabierta	201
5.-	REFERENCIAS	201

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Valores de los coeficientes usados para calcular las actividades iónicas.	31
Tabla 3.1 Parámetros de ajuste de la relación de conductancia vs. $[Na^+]$ con el modelo de barreras	89
Tabla 3.2 Parámetros de ajuste derivados de los valores de la tabla 3.1 y de las relaciones corriente-voltaje en condiciones bilónicas y simétricas de sodio.	91
Tabla 3.3 Parámetros obtenidos del ajuste de registros simulados	116
Tabla 3.4 Valores de $L(\theta)$ obtenidos a partir del ajuste de los datos de la figura 3.25 con dos conjuntos de números aleatorios	135
Tabla 3.5 Modelo II: Valores de $k_{ij}(V_o)$ y de n_{ij}	145
Tabla 4.1 Cuadro comparativo de los valores de K_{ap} , de conductancia máxima (g_{max}) y de densidad de cargas de superficie descritos para otros canales de sodio modificados por BTX.	158
Tabla 4.2 Cuadro comparativo de los parámetros de ajuste con el modelo de barreras a las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ de otros canales de sodio incorporados a bicapas planas de lípidos	160

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Relación entre la bondad del ajuste y la posición de los pozos de energía	34
Figura 2.2 ϕ vs. $[D^{++}]$	36
Figura 3.1 Registros de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas.	48
Figura 3.2 Registros de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas.	51
Figura 3.3 Relaciones corriente-voltaje de los canales provenientes de ambas preparaciones	52
Figura 3.4 P_o en función del voltaje	55
Figura 3.5 Comparación entre un registro con dos canales diferentes y un registro de un canal con dos conductancias diferentes	58
Figura 3.6 Los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas tienen un subestado de mayor conductancia	61
Figura 3.7 Los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas tienen un subestado de menor conductancia	64
Figura 3.8 Presencia de subestados a bajas concentraciones de sodio	68
Figura 3.9 Relaciones corriente-voltaje obtenidas a partir de los histogramas de frecuencia de amplitudes.	71

Figura 3.10 Conductancia promedio de todos los eventos de apertura o cierre vs. $[Na^+]$	73
Figura 3.11 Relaciones corriente-voltaje para los canales de ambas preparaciones	75
Figura 3.12 Relación de conductancia vs. $[Na^+]$ para los subestados de conductancia de ambas preparaciones	79
Figura 3.13 Relaciones corriente-voltaje en condiciones bilónicas	83
Figura 3.14 Modelo de barreras	87
Figura 3.15 Bloqueo a bajas concentraciones de sodio	95
Figura 3.16 Efecto anómalo de la fracción molar	98
Figura 3.17 Examen de estabilidad de P_o en función del tiempo	102
Figura 3.18 Efecto de bajar la concentración de sodio en el lado interno del canal	106
Figura 3.19 Efecto de subir la concentración de sodio en ambos lados del canal	110
Figura 3.20 Distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado abierto	114
Figura 3.21 Distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado cerrado	119
Figura 3.22 Constantes de tiempo en función del voltaje normalizado	123
Figura 3.23 Fracción de eventos de cada componente exponencial en función del voltaje normalizado	125
Figura 3.24 Análisis de correlación entre eventos abiertos y cerrados adyacentes	128
Figura 3.25 Distribuciones de los tiempos de permanencia y ajuste con los modelos cinéticos	133
Figura 3.26 Análisis de correlación entre eventos adyacentes de los registros simulados con los modelos cinéticos	137
Figura 3.27 Modelo II: Ajuste de máxima verosimilitud de las distribuciones experimentales a tres diferentes voltajes	140
Figura 3.28.A Efecto del voltaje sobre las constantes cinéticas del modelo II: 200 mM Na^+	142
Figura 3.28.B Efecto del voltaje sobre las constantes cinéticas del modelo II: 3,0 M Na^+	143
Figura 3.29 Propiedades cinéticas del canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas	148

Figura 3.30 Distribuciones de tiempos de permanencia de un canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de Inhibidores de proteasas	150
Figura 4.1 Relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ para diferentes canales de Na^+ modificados por BTX	162
Figura 4.2 Comparación con el canal de músculo esquelético de rata	164
Figura 4.3 Ocupación del canal de sodio en función de $[\text{Na}^+]$	166
Figura 4.4 Modelo G&A para el desplazamiento de la curva de activación en un canal de dos estados	179
Figura 4.5 Enzayo de la condición de reversibilidad microscópica en el modelo II.	195

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

a	: Actividad iónica
A_{X-Y}	: Factor de repulsión electrostática entre dos iones dentro de la vía de conducción
A	: Factor de frecuencia, $\approx 10^{11} \text{ s}^{-1}$
BTX	: Batracotoxina
δ	: Distancia eléctrica fraccional dentro de la vía de conducción
$[D^{++}]$: Concentración de un catión divalente
dc-STX	: Decarbamoylsaxitoxina
ϵ_0	: Constante de permitividad del vacío
ϵ_w	: Constante dieléctrica del agua
-e	: Carga electrónica
ϕ	: Potencial en una superficie cargada, en mV
f	: fracción molar Na-Li, $f = [Na^+] / ([Na^+] + [Li^+])$
F	: Constante de Faraday
$F(t \theta)$: Función densidad de probabilidad evaluada en t sobre un conjunto θ de parámetros
g	: Aceleración de gravedad, 10 m/s^2
G_p	: Energía libre de un ion en un sitio del sistema de conducción
G^*	: Energía libre de un ion en un pico de la barrera del sistema de conducción
h	: Partícula de inactivación de los canales de Na^+ en el modelo de Hodgkin y Huxley

Hz	: Hertz, s^{-1}
k	: Constante de Boltzmann
k_{ij}	: Constante de rapidez de transporte desde un sitio I a un sitio J
k_{ij}	: Constante cinética de transición entre los estados cinéticos I y J
K_{ap}	: Constante aparente de disociación del ion transportado por el canal
K_D	: Constante aparente de disociación de un ión inhibidor de la corriente unitaria
$L(\theta)$: Logaritmo de la verosimilitud evaluada para un conjunto θ de parámetros
L_I	: Logaritmo de la verosimilitud evaluada en el intervalo I de la distribución de tiempos de permanencia
μM	: micromolar, 10^{-6} M
m	: Partícula de activación en el modelo de Hodgkin y Huxley
Mops	: Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
n	: Valencia efectiva para el proceso de apertura y cierre de un canal
n_{ij}	: Valencia efectiva para del proceso transición entre dos estados cinéticos I y J
nm	: Nanómetros, 10^{-9} m
pA	: Picoampere, 10^{-12} A
pF	: Picofaradio, 10^{-12} F
pS	: Picosiemens, 10^{-12} S = 10^{12} ohm
P_{max}	: Probabilidad máxima de encontrar el canal abierto
P_o	: Probabilidad de encontrar el canal abierto
P_X/P_{Na}	: Razón de permeabilidades entre los iones X^+ y Na^+
R	: Constante de los gases
σ	: Densidad de carga superficial, $-enm^{-2}$
STX	: Saxitoxina
TMO	: Tetrametiloxonio
TTX	: Tetrodotoxina
V_o	: Voltaje al cual $P_o = 1/2 P_{max}$
V_r	: Potencial de inversión

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el grado de ocupación iónica del canal de sodio modificado por batracotoxina (BTX) y de entender el mecanismo la acción de esta toxina sobre el canal de sodio, se estudiaron, en un amplio intervalo de concentraciones de sodio, las propiedades de conducción iónica y las características cinéticas del canal de Na^+ modificado por BTX del músculo esquelético de rana. Para hacer este estudio, se fusionaron a bicapas de lípidos vesículas de membranas de túbulos transversales de músculo de la rana chilena *Caudiververa caudiververa* obtenidas en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas.

Los estudios del sistema de conducción iónica del canal de sodio modificado por BTX muestran que:

I.- En presencia de NaCl 200 mM en ambos lados de la bicapa los canales provenientes de la preparaciones hechas en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas muestran una conductancia predominante de 16,6 (gama_1) y 11,4 pS (gama_2), respectivamente. Ambas conductancias son estados conformacionales del canal, ya que, ambos estados de conductancia se observan en los canales provenientes de ambas preparaciones. En el intervalo de concentraciones comprendido entre 0,4-3000 mM la razón $\text{gama}_1/\text{gama}_2$ es constante y es $\approx 1,5$.

ii.- A concentraciones de Na^+ mayores que 10 mM, las relaciones corriente-voltaje tienen la misma forma, tanto a potenciales positivos como a los negativos, en cambio, a concentraciones menores que 10 mM estas relaciones son lineales a potenciales negativos y sublineales a potenciales positivos.

iii.- Para los dos estados de conductancia, las relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ no pueden ser ajustadas con una simple isoterma de Langmuir. Para explicar los datos fue necesario usar un modelo de conducción con dos sitios de unión y tres barreras de energía que permite ocupación doble, además, el modelo incorpora el efecto de la presencia de carga superficial negativa en las bocas del canal que modifica tanto el perfil de energía del sistema de conducción, como la concentración de Na^+ en las bocas del canal.

iv.- Para ambas conductancias, la densidad de cargas de superficie que afectan la conducción iónica es mayor en el lado externo que en el lado interno. A la luz del modelo de barreras propuesto, las diferencias entre γ_1 y γ_2 pueden ser explicadas suponiendo sólo una diferencia de $\approx 0,4$ kT en la altura de las barreras de energía.

v.- Se hicieron experimentos para buscar apoyo adicional a las hipótesis de la presencia de carga superficial negativa en la boca del canal y de ocupación múltiple. A baja concentración de sodio, a menos que se incorpore el efecto de cargas superficiales negativas en la vía de conducción del canal, el bloqueo por Cs^+ , Ba^{++} y Mg^{++} no puede ser descrito por una isoterma simple de inhibición. Por otra parte, una demostración de que el canal de sodio modificado por BTX permite ocupación múltiple se obtuvo en soluciones compuestas de mezclas de NaCl y LiCl a fuerza iónica constante. Cuando la relación $[\text{Na}^+]:[\text{Li}^+]=0,18:0,82$, la conductancia del canal es anómalamente baja; ella es menor que en cada una de las sales por separado.

El estudio de las características cinéticas del canal de sodio modificado por BTX muestra que:

vi.- Las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado indican que el canal tiene dos estados abiertos y tres estados cerrados.

vii.- La cinética del canal es afectada por cambios en la concentración de Na^+ . Este efecto se observa como un desplazamiento de +50 mV en la curva de activación cuando la concentración de Na^+ es llevada desde 0,2 hasta 3,0 M. Las distribuciones de tiempos de permanencia en el estado abierto y cerrado se desplazan en el eje del voltaje en la misma magnitud que la curva de activación. Estos resultados pueden ser explicados suponiendo que la densidad de cargas de superficie que afectan la cinética es mayor en el lado externo que en el lado interno.

viii.- Existe correlación inversa entre eventos abiertos y cerrados adyacentes. El grado de correlación es más pronunciado a medida que el potencial aplicado es más negativo. Además, el grado de correlación inversa entre eventos adyacentes encontrado en los canales provenientes de ambas preparaciones (gama_1 y gama_2) puede ser explicado adecuadamente con un mismo esquema cinético cíclico.

ix.- A la luz del esquema cinético propuesto para el canal modificado, los efectos de la BTX sobre la cinética del canal de sodio se pueden interpretar como, 1.- la creación de un nuevo estado conductor y 2.- la estabilización de la conformación abierta del canal.

De los resultados obtenidos en esta tesis se concluye que el canal de sodio modificado por BTX es un canal que permite ocupación múltiple, confirmando observaciones obtenidas en el canal de sodio no modificado del axón gigante de calamar (Begenisich y Cahalan, 1980a). A bajas concentraciones de sodio, la conductancia es modulada por cargas negativas presentes en las bocas del canal. Además, el canal presenta por lo menos cinco estados cinéticos diferentes, dos estados abiertos y tres cerrados. El comportamiento cinético del canal puede ser descrito con un esquema cíclico y es afectado por la presencia de cargas negativas en las superficies interna y externa, siendo mayor la densidad de cargas en la superficie externa.

ABSTRACT

In order to elucidate whether or not the BTX-modified sodium channel is a multi-ion channel, and to understand the mechanism of action of the toxin on this channel, ion conduction properties and kinetic characteristics of BTX-modified channels from frog skeletal muscle were studied in a wide range of sodium concentrations. These studies were performed using transverse tubule membrane preparations from the Chilean frog *Caudiverrera caudiverrera*. The membrane vesicles were fused to planar lipid bilayers. Membrane fractions were obtained in the presence and in the absence of protease inhibitors.

The studies on ionic conduction showed that:

i.- With 200 mM NaCl bathing both sides of the membrane, channels obtained from preparations made in the presence and in the absence of protease inhibitor show predominantly conductance states of 16,6 (g_{ama_1}) and 11,4 pS (g_{ama_2}), respectively. Both conductance states are seen in channels from both preparations and appear to be conformational states of the channel. The ratio $g_{\text{ama}_1}/g_{\text{ama}_2}$ is constant and $\approx 1,5$ in the range 0,4-3000 mM of Na^+ concentration.

ii.- At Na^+ concentrations greater than 10 mM, current-voltage relations are approximately linear in the range of potentials studied, but at Na^+ concentrations less than 10 mM current-voltage

relations are sublinear at positive potentials.

iii.- g_{ama_1} and g_{ama_2} conductance vs. $[Na^+]$ relations can not be fitted with a single Langmuir isotherm. Data can be well explained with a three barriers-two sites model which allows double occupation. Also, the model includes the effects of negative surface charge at the channel entrances. These charges modify the energy profile of the conduction system, the local Na^+ concentration and explain the larger values of channel conductance at low ionic strength.

iv.- For both conductance states, the surface charge density affecting ionic conduction is greater at the external side of the channel than at the internal side. The differences in conductance between g_{ama_1} and g_{ama_2} can be well explained assuming a difference of ≈ 0.4 kT in the heights of the energy barriers.

v.- Additional evidence for surface charge effect on conductance and for multi-ion occupancy presence at low Na^+ concentrations, Cs^+ , Ba^{++} and Mg^{++} blocking effects were well fitted only when surface charge effects were included in a inhibition isotherm. In addition, a demonstration that the BTX-modified sodium channel is a multi-ion channel was found in mixed solutions of NaCl and LiCl at constant ionic strength. When $[Na^+]:[Li^+]=0.18:0.82$, single channel conductance is anomalous lower than found in symmetrical solutions of equivalent concentrations of either monovalent cation.

The studies of the kinetic characteristics of the BTX-modified sodium channel showed the following results:

vi.- Dwell open and close time analysis shows two open and three closed states.

vii.- Kinetic behavior of the channel is affected by changes in the sodium concentration. This effect is seen as a +50 mV displacement of the activation curve when Na^+ is increased from 0.2 to 3.0 M. Both open and closed dwell times-voltage relations are equally displaced. These results can be explained assuming that the gating machinery senses the effect of a larger negative charge density from the external side than from the internal.

viii.- Adjacent open and closed durations are inversely correlated. The degree of correlation

is higher as the voltage is made more negative. In addition, the degree of inverse correlation found in channels from both preparation (γ_1 y γ_2) can be described with the same cyclic kinetic scheme.

ix.- Under the proposed cyclic kinetic scheme, the effects of BTX on the sodium channel kinetics can be interpreted as 1.- creation of a new conductive state and 2.- an stabilizing action on the open state of the channel.

In this thesis it is concluded that the BTX-modified channel is a multi-ion channel. This observation confirms previous results obtained in the non-modified sodium channels from squid giant axon (Begenisch and Cahalan, 1980a). At low sodium concentrations, single channel conductance is modulated by negative fixed charges located at the channel entrances. In addition, the BTX-modified sodium channel shows at least five kinetic states; two open and three closed. The kinetic behavior of this channel can be described by a cyclic kinetic scheme which includes the effect of negative surface charges located at the external and internal surfaces. The external surface charge density is higher than in the internal side.

1.- INTRODUCCION

El axón gigante de calamar en respuesta a un estímulo umbral genera un potencial de acción. Este consiste en una despolarización rápida desde el potencial de reposo (-60 mV intracelular) hasta un valor cercano al potencial de equilibrio del Na^+ (entre 30 y 60 mV). Esta despolarización es seguida de una repolarización más lenta hasta un valor cercano al potencial de equilibrio del K^+ (entre -70 y -80 mV). Este proceso tiene una duración menor que 4 ms a temperatura ambiente y el mecanismo por el cual se genera está descrito en los trabajos que Hodgkin y Huxley publicaron en 1952. Tal mecanismo consiste de una secuencia de cambios de permeabilidad de la membrana dependientes del voltaje y del tiempo: primero se produce un aumento de la permeabilidad al sodio que permite una corriente de entrada de Na^+ que despolariza la fibra. La fase repolarizante posterior es producida por la disminución de la permeabilidad al Na^+ y un aumento de la permeabilidad al potasio que permite una corriente de salida de K^+ .

Las estructuras responsables de los cambios de permeabilidad para los iones Na^+ y K^+ en el axolema son entidades discretas llamados canales iónicos (o poros) cuya apertura y cierre es regulada por la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana. En la última década, gracias al desarrollo de nuevas técnicas electrofisiológicas se ha obtenido un gran caudal de información sobre los canales iónicos. Con las técnicas de "patch clamp" e incorporación de canales a bicapas de lípidos (Sackmann y Neher, 1983; Miller, 1986; Latorre, 1986) ha sido posible

estudiar estos canales iónicos en forma individual. La técnica de "patch clamp" consiste en aislar eléctricamente un área pequeña de membrana (menor que $1 \mu\text{m}^2$) y registrar la corriente que pasa a través de ella. Con esta técnica ha sido posible registrar la corriente unitaria de canales de sodio (Sigworth y Neher, 1980; Horn y cols., 1981). En respuesta a un pulso despolarizante los canales se activan en el intervalo de voltaje entre -50 y -10 mV mostrando períodos cortos en que se abren y se cierran rápidamente para luego pasar al estado inactivado.

1.1 Los canales iónicos son proteínas.

La naturaleza proteica de los canales iónicos fue demostrada indirectamente en 1963 por Rojas y Luxoro. Ellos observaron que la respuesta excitatoria del axón era eliminada completamente al cabo de algunos minutos después de una microinyección de tripsina. Más tarde Armstrong y cols. en 1973 encontraron que la inactivación de las corrientes de sodio es eliminada cuando el axón es perfundido con pronasa.

La farmacología del canal de sodio es muy rica y variada. Existe gran cantidad de toxinas específicas para este canal, entre ellas podemos destacar a la tetrodotoxina (TTX) y a la saxitoxina (STX) que inhiben las corrientes de sodio, y a la batracotoxina (BTX) que impide la inactivación de las corrientes de sodio (Hille, 1984; Khodorov, 1985). Gracias al uso de toxinas como TTX y STX marcadas radioactivamente ha sido posible purificar los canales de sodio del órgano eléctrico de la anguila, del sarcolema de músculo esquelético de rata y de sinaptosomas de cerebro de rata (Agnew y cols, 1978; Barchi y cols., 1980; Hartshone y Catterall, 1981). El canal de sodio es una proteína de 230 a 300 kD que se encuentra altamente glicosilada (Miller y cols., 1983). En efecto, experimentos de expresión de mRNA del canal de sodio en electrocitos de anguilla incubados en presencia de metionina- ^{35}S indican que 24 horas después de la síntesis, la proteína-canal ha cambiado su peso molecular de 200 a 290 kD (Thornhill y Levinson, 1987). Este 30% de incremento en la masa aparente es debida a la incorporación de carbohidratos a la proteína (Levinson y cols., 1990).

Actualmente se conoce la secuencia de nucleótidos de los cDNA de los canales de sodio

de la electroplaca de anguila, del cerebro y músculo esquelético de rata (Noda y cols., 1984; Numa y Noda, 1986; Kayano y cols., 1988; Trimmer y cols., 1989); al compararlas, se encuentra una gran homología de bases entre ellos y con las secuencias de otros canales activados por voltaje, como el canal de calcio de músculo esquelético (Tanabe y cols., 1987) y la de los canales de potasio de músculo de *Drosophila* (Tempel y cols., 1987; Catterall, 1988).

El análisis del índice hidrofóbico de los aminoácidos permite proponer qué segmentos de la proteína cruzan la membrana y qué regiones están expuestas al medio intracelular o extracelular. De esta manera se ha propuesto que el canal de potasio de *Drosophila* expone hacia el lado citoplasmático dos grandes dominios que contienen los extremos amino y carboxilo terminales. Entre ambos dominios existe una región que contiene una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos y que estaría compuesta de seis segmentos (S1 a S6) que cruzan la membrana. Estos segmentos son los que participan en la formación del canal. En esta descripción el canal es un oligómero que se forma por la aposición de cuatro unidades idénticas.

Las secuencias de aminoácidos deducidas para los canales de sodio y de calcio muestran que la región que forma el canal, es decir, la región compuesta de los segmentos S1 a S6 está repetida cuatro veces en la secuencia, por esta razón, se propone que los canales de sodio y de calcio están formados por monómeros.

Lo más notable en estas descripciones es que el segmento S4 de todos los canales muestra cuatro a seis aminoácidos cargados positivamente (lisinas o argininas). Estos aminoácidos se disponen, en la cadena peptídica, separados regularmente cada dos residuos hidrofóbicos. Sobre la base de esta observación, Noda y cols. (1984), propusieron que en los segmentos S4 del canal de sodio se encuentran las estructuras responsables de que la cinética de apertura y cierre del canal sea dependiente del voltaje. En efecto, Stümers y cols. (1989), observaron que los canales de sodio sometidos a mutaciones puntuales que sustituyen algunos de los residuos cargados positivamente por aminoácidos neutros en el segmento S4 tienen una dependencia del potencial menor que la que muestran los canales nativos. Dada la gran similitud en la secuencia de aminoácidos del segmento S4 en todos los canales activados por voltaje estudiados, es posible

proponer que en toda esta familia de canales, el segmento S4 forma parte importante de la estructura responsable de la cinética de apertura y cierre. Más aún, estos resultados permiten proponer un modelo estructural común para todos los canales activados por el potencial eléctrico (Catterall, 1988).

1.2 Conducción y cinética de los canales iónicos.

Las propiedades que identifican funcionalmente a un tipo de canal son su selectividad, conductancia unitaria y cinética. Estas propiedades reflejan características estructurales de ellos. En el caso del canal de sodio el alto grado de glicosilación debe reflejarse en términos funcionales, por lo tanto, es esperable que algunas o todas las propiedades antes mencionadas sean afectadas por la alta concentración de ácido siálico en la superficie del canal (Thornhill y Levinson, 1987; Levinson y cols., 1990), es decir, la conducción iónica, la selectividad y la cinética debieran ser afectadas por el potencial de superficie originado por la alta densidad de cargas negativas.

1.2.1 Conducción iónica.

Al abrirse un canal, el flujo de iones a través de él se produce a favor del gradiente electroquímico. Si la conducción iónica a través de un canal fuera como por un poro acuoso en que los iones se muevan tan libremente como en el resto de la solución, se esperaría que el flujo de iones en un sentido sea independiente del flujo en sentido contrario. Por otra parte el flujo medido debiera ser proporcional al potencial eléctrico presente a través de la membrana y a la concentración de la especie transportada (Goldman, 1943). Otra de las predicciones de este modelo es que la razón de permeabilidades entre dos especies iónicas debe ser igual a la razón de conductancias, puesto que la permeabilidad depende de la facilidad con que los iones ocupan el canal (Hille, 1975a).

En 1955, Hodgkin y Keynes observaron que el flujo de salida de $^{42}\text{K}^+$ en el axón gigante es reducido al aumentar la concentración externa de potasio, esto sugirió que, contrariamente a lo predicho para un poro acuoso, los flujos de entrada y de salida no son independientes. Más aún,

el grado de alejamiento de lo predicho para flujos independientes puede ser explicado si el poro es ocupado simultáneamente por 2 o 3 iones K^+ que se mueven en fila india.

Por otra parte, la conductancia tanto de los canales de sodio como de los de potasio muestra saturación con la concentración iónica (Hille, 1975; Begenisich y Cahalan, 1980b; Latorre y Miller, 1983). Esto indica que los iones deben unirse a un sitio dentro del canal en su tránsito desde un lado a otro de la membrana. Además, la corriente es inhibida por iones que no pasan a través del canal, como es el caso de los protones en los canales de sodio y el tetraetilamonio (TEA) y Cs^+ en los canales de potasio (Woodhull, 1973; Armstrong, 1975; Coronado y Miller, 1979). En estos casos la intensidad del efecto inhibitorio depende del potencial aplicado. Esto indica que el ion impermeante se une a un sitio dentro de la vía de conducción del canal pero que no pasa a través de él. Estos resultados son incompatibles con un modelo de poro acuoso, pues, en este último, el ión que ocupa el poro debe ser transportado.

1.2.1.1 Modelos de barreras de energía

Imaginemos que durante su paso a través del canal, un ion se une a uno o más sitios en la vía de conducción. Estos sitios representan estados más o menos estables, es decir, mínimos o pozos de energía. Para entrar o salir de un pozo, el ión debe saltar una barrera de energía. De manera que para describir el mecanismo de transporte a través del canal, podemos decir que el ion va saltando de pozo en pozos de energía hasta que cruza el canal y, además, la rapidez con que pasa desde un pozo a otro decrece exponencialmente con la altura de la barrera que debe saltar. Para el caso del canal de sodio, la formalización de este tipo de descripción fue elaborada por Hille (1975a). Este modelo se basa en la teoría de velocidades absolutas de reacción (Glasstone y cols. 1941). Varios autores han extendido este tratamiento a varios sitios y ocupación múltiple para describir el transporte iónico a través de varios tipos de canales iónicos (Hess y Tsien., 1984; Alvarez y cols., 1991; ver revisión en Hille, 1975b, 1984). La sección 2.5.1.2.1. contiene una descripción de la teoría de conducción con modelos de barreras de energía.

Con modelos de barreras y ocupación por un solo ion es posible dar cuenta de la

saturación de los canales, del bloqueo y de las relaciones corriente-voltaje (por ejemplo Hille, 1975a; Correa y cols., 1990; Coronado y cols., 1980; Cecchi y cols., 1981).

1.2.1.2 Ocupación múltiple en canales iónicos.

Si la distancia a través de la cual se produce el proceso de conducción iónica es muy corta, debido a la repulsión electrostática, una vez ocupado alguno de los sitios, la ocupación de un segundo sitio se hace improbable, es decir, una vez ocupado el canal por un ion, los valores de energía de los pozos y picos para un segundo ion crecen. Así, la fracción de iones que tienen energía suficiente como para entrar en la vía de conducción es menor. Sin embargo, si la vía de conducción es suficientemente larga, o a altas concentraciones del catión transportado, la probabilidad de que dos o más sitios estén ocupados simultáneamente aumenta. Más aún, a altas concentraciones del catión, puede que la rapidez con que los iones entran a la vía de conducción sea mayor que la rapidez con que los iones son transportados a través del canal; entonces, se produce una disminución de la corriente, pues los iones no pueden saltar a sitios ya ocupados (Villarreal, 1989). Por esta razón, es necesario incorporar otra condición al modelo de barreras; esta condición es que los iones viajan en fila india (Hodgkin y Keynes, 1955).

En muchos canales iónicos se han obtenido resultados que no pueden ser explicados con modelos de barreras que solo permiten un ion. Estos resultados se han tomado como prueba de ocupación múltiple. Por ejemplo, Villarreal (1989) observó en el canal de potasio activado por calcio que la curva de conductancia vs. $[Rb^+]$ después de alcanzar un máximo a 2 M comienza a decrecer a concentraciones mayores. En el rectificador tardío (Hagiwara y cols., 1977), en el canal de calcio tipo L del corazón (Hess y Tsien, 1984) y el canal de potasio activado por calcio (Eisenman y cols., 1986) se ha observado que en mezclas de dos iones la conductancia del canal es menor que para cada ion por separado. En un modelo que permite un solo ion, la conductancia del canal en una mezcla de dos iones debiera tener un valor intermedio entre los valores de conductancia de cada una de las dos especies iónicas (Hille, 1984). Además, fenómenos como el bloqueo por iones Cs^+ en el canal de potasio activado por calcio en que la distancia eléctrica de

bloqueo (δ) es mayor que 1 (Cecchi y cols., 1987, ver sección 2.5.1.2.1), tampoco pueden ser explicados con un modelo de barreras que acepte un solo ion a la vez. Todos estos resultados han sido explicados con modelos de barreras que permiten ocupación múltiple.

1.2.1.3 Potencial de superficie en canales iónicos

Si en la superficie del canal existen cargas negativas fijas que generan un potencial superficial, entonces, la concentración de cationes en las bocas del canal es mayor que en el seno de la solución. Debido a la acumulación de cationes la conductancia de un canal cargado negativamente es mayor que la de un canal equivalente pero no cargado. Suponiendo que los cationes en solución siguen una distribución de Boltzmann (McLaughlin, 1989, Alvarez y cols., 1991, Latorre y cols., 1991), es posible calcular su concentración local en las bocas del canal y, por lo tanto, medir el efecto de las cargas sobre el sistema de conducción de un canal. Puesto que los cationes encubren las cargas de superficie, a altas concentraciones iónicas la diferencia entre la concentración local y del seno de la solución tiende a cero.

La existencia de cargas negativas fijas en la superficie que afecten la conducción iónica ha sido demostrada en el canal de potasio activado por calcio del músculo esquelético de rata (Moczydlowski y cols., 1985; MacKinnon y cols., 1989). En este canal se observó que el trimetiloxonio (esterificador de grupos carboxilos) reduce la conductancia unitaria del canal. La reducción de conductancia en canales tratados con trimetiloxonio es más notoria a concentraciones bajas de potasio como debería esperarse debido al fenómeno de encubrimiento de las cargas de superficie a concentraciones altas de sales.

1.2.2 Cinética

1.2.2.1 Descripción Clásica

La corriente que pasa a través del axolema durante el potencial de acción es la suma de todas las corrientes iónicas más la corriente capacitiva (Hodgkin y Huxley, 1952):

$$I = I_{Na} + I_K + I_L + C_m \frac{dV}{dt}, \quad (1.1)$$

en que I_{Na} , I_K son las corrientes de sodio y potasio respectivamente, I_L es la corriente inespecifica de fuga y depende del estado de la membrana y $C_m dV/dt$ es la corriente capacitiva. Para determinar la participación de cada componente de la corriente, es conveniente fijar una variable. Hodgkin y Huxley (1952) fijaron el potencial. En respuesta a un pulso de potencial despolarizante, la conductancia al sodio aumenta transitoriamente, indicando que la fracción de canales de sodio que se encuentran en estado conductor es dependiente del voltaje y del tiempo. Así, la corriente de sodio estará dada por:

$$I_{Na} = N F_o(V,t) g_i (V - V_{Na}), \quad (1.2)$$

en que N es el número de canales de sodio funcionales presentes en la membrana, $F_o(V,t)$ es la fracción de esos canales en estado conductor, g_i es la conductancia de cada canal y $(V - V_{Na})$ es la fuerza electromotriz que mueve a los iones sodio a través del canal. En este modelo, la fracción de canales de sodio en estado conductor está determinada por dos procesos cinéticos diferentes: la activación (m , o apertura) y la inactivación (h). Según el modelo de Hodgkin y Huxley estos procesos son independientes. Además, dado que la etapa temprana de la curva de corriente de sodio vs. tiempo en respuesta a un pulso despolarizante posee una forma sigmoídea y decae de manera exponencial cuando el pulso es interrumpido tempranamente, esta curva puede ser descrita suponiendo que la conductancia al sodio es proporcional a la tercera potencia del proceso de primer orden m . En términos físicos esto se puede interpretar suponiendo que el canal de sodio se abre sólo cuando tres partículas cargadas iguales se han desplazado hacia una determinada posición dentro del campo eléctrico, de la misma manera, cuando cualquiera de ellas abandona esa posición, el canal se cierra. Si m representa la fracción de partículas en el extremo activo (por ejemplo en el lado interno del canal), entonces, $1-m$ es la fracción en el extremo opuesto (externo). Este equilibrio está representado en el esquema 1.3.

$$1 - m \rightleftharpoons \frac{\alpha_m}{\beta_m} m, \quad (1.3)$$

en que α_m es la constante cinética de desplazamiento de la partícula desde el lado externo al interno, β_m es la constante cinética para el desplazamiento en sentido contrario. Si las partículas

son cargadas negativamente, entonces, α_m aumenta y β_m decrece cuando la membrana es despolarizada. De la misma manera es posible escribir un esquema cinético para la fracción de partículas h que se encuentra en el estado activo:

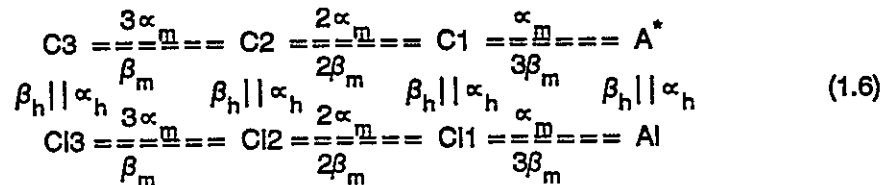
$$1 - h \xrightleftharpoons[\beta_h]{\alpha_h} h \quad (1.4)$$

en que α_h y β_h son las constantes cinéticas del movimiento de la partícula h hacia el lado activo y desde el lado activo respectivamente. Puesto que la despolarización inactiva los canales, es decir la dependencia del potencial de la fracción de partículas h en el estado activo es inversa a la dependencia del potencial de las partícula m , entonces, en la interpretación física anterior, la partícula h está cargada positivamente.

Entonces, la conductancia al sodio de la membrana del axón queda descrita por la siguiente ecuación.

$$I_{Na} = g_{Na} m^3 h (V - V_{Na}), \quad (1.5)$$

en que g_{Na} corresponde a la conductancia máxima al ion sodio. En términos cinéticos, la descripción de Hodgkin y Huxley se hace equivalente al siguiente esquema:



en que A^* y $A1$ corresponden a los estados abierto y abierto- inactivado respectivamente, $C3$, $C2$ y $C1$ representan los estados cinéticos con 0, 1 y 2 partículas en el extremo activo, $C13$, $C12$ y $C11$ representan los estados cinéticos con 0, 1 y 2 partículas en el extremo activo pero en el estado inactivado. El único estado conductor es A^* . La constante cinética de paso entre $C3$ y $C2$ es tres veces mayor que entre $C1$ y A^* pues en el primer caso con cualquiera de las tres partículas que cambie de posición se abandona el estado $C3$, en cambio, en el segundo caso sólo existe una partícula que aún se puede desplazar hacia el estado activo. Este mismo principio se aplica para las otras ramas del esquema cinético.

1.2.2.2 Los procesos de apertura y de inactivación de los canales de sodio están acoplados.

Una de las predicciones hechas por Hodgkin y Huxley al proponer su modelo de las partículas cargadas, es que en respuesta a un pulso en forma de escalón de voltaje, estas partículas, al reordenarse en el campo eléctrico, producirán una corriente eléctrica transitoria. En 1974, Armstrong y Bezanilla, por una parte, y Keynes y Rojas (1974), por otra, trabajando con el axón gigante de calamar bañado con una concentración baja de Na^+ , encontraron que en respuesta a un escalón despolarizante, se produce una corriente no iónica que precede a la corriente de sodio. El decaimiento de esta corriente coincide con el curso temporal del aumento de la conductancia al sodio, indicando que todo el desplazamiento de cargas es previo a la apertura del canal (como predice el modelo de Hodgkin y Huxley).

En el axón gigante, los prepulsos despolarizantes de distinta duración, inactivan reversiblemente la corriente de sodio, la fracción de corriente remanente depende fuertemente de la duración del prepulso condicionante. Así, con prepulsos muy breves, la amplitud de la corriente no es afectada, en cambio, prepulsos de larga duración inactivan completamente la corriente de sodio (Hodgkin y Huxley, 1952). El curso temporal con que la corriente de sodio es inactivada es más rápido con despolarizaciones mayores. Usando el protocolo de pulsos descrito anteriormente, Armstrong y Bezanilla (1977) encontraron que los prepulsos despolarizantes reducen una fracción de la carga no iónica desplazada de la misma manera que reducen las corrientes de sodio, a esta fracción se le llamó carga inmovilizada. El curso temporal de la inmovilización de carga se superpone completamente con la cinética de inactivación de la corriente de sodio. De estos resultados Armstrong y Bezanilla propusieron que la inactivación no es independiente del proceso de apertura, pues, en el modelo de las partículas cargadas estas debieran moverse independientemente si los canales están o no inactivados. Más aún, a partir de estos resultados y los de remoción de la inactivación con pronasa (Armstrong y cols., 1973; ver sección 1.1), Armstrong y Bezanilla (1977) propusieron que la partícula h de inactivación era un grupo de la proteína cargado positivamente y expuesto al axoplasma (de tal manera que puede ser atacado por enzimas proteolíticas). Este grupo protéico, es móvil ("A ball in a chain", aquí le llamaremos 'grupo

móvil'). Así cuando el canal se abre, éste expone un sitio cargado negativamente hacia el lado interno. Cuando el 'grupo móvil' se une al sitio expuesto, se produce un bloqueo de la conducción iónica que da lugar a la inactivación. En consecuencia, en este modelo, el canal debe abrirse antes de ser inactivado.

1.3 Antecedentes específicos de este trabajo.

1.3.1 El canal de sodio puede ser ocupado por más de un ion a la vez.

Meves y Chandler (1965), trabajando en el axón de calamar, descubrieron que en el canal de sodio la razón de permeabilidades P_K/P_{Na} aumenta al bajar la concentración intracelular de K^+ . Un resultado similar se obtuvo al bajar las concentraciones de Na^+ y NH_4^+ en canal de sodio del axón de calamar (Begenisich y Cahalan, 1980a). Estos resultados pueden ser explicados sólo si el canal permite ser ocupado por más de un ion simultáneamente. Aunque el sistema de conducción del canal puede alojar más de un ión a la vez, el exponente de la razón de flujos de $^{22}Na^+$ es cercano a uno, lo que indica que a concentraciones fisiológicas de sodio la probabilidad de ocupación múltiple es baja (Begenisich y Busath, 1981).

1.3.2 La BTX modifica funcionalmente a los canales de sodio.

Las fibras de músculo esquelético tratadas con BTX se despolarizan gradualmente hasta llegar a un valor cercano a 0 mV. Esta despolarización es evitada si la fibra se incuba simultáneamente con TTX. Por otra parte, los experimentos de potencial controlado muestran que en presencia de BTX las corrientes de sodio no se inactivan (Albuquerque, 1972). De estas observaciones, se concluyó que una fracción importante de los canales de sodio tratados con BTX están abiertos al potencial de reposo y que en ellos no se produce el proceso de inactivación.

Los registros de canales individuales en células de neuroblastoma y en axón gigante muestran que la conductancia de los canales modificados por BTX es un 50% de la conductancia de los canales no modificados (≈ 1 pA; Quandt y Narahashi., 1982; Correa y cols., 1990). Por otra parte la duración promedio del estado abierto del canal es un orden de magnitud más largo que en

el canal no modificado.

Estos efectos de la BTX sobre las propiedades cinéticas del canal de sodio han permitido estudiar canales de Na^+ de diversos orígenes en bicapas artificiales de lípidos (Krueger y cols., 1983; Moczydlowsky y cols., 1984a; 1984b; Green y cols., 1987a; Behrens y cols., 1989), pues, en este sistema experimental la resolución temporal es insuficiente para registrar canales con una cinética y conductancia como la del canal Na^+ no tratado con toxinas.

1.3.3. Conducción iónica en el canal de sodio modificado por BTX.

A pesar de que el canal de sodio es un canal que puede aceptar más de un ion a la vez (Begenisich y Cahalan, 1980a), los estudios de la conductancia del canal modificado por BTX en función de la concentración de sodio han sido explicados suponiendo que la vía de conducción del canal permite sólo un ion a la vez (Moczydlowsky y cols., 1984; French y cols., 1986b; Green y cols., 1987a; Behrens y cols., 1989).

Para dar cuenta de esta discrepancia, es necesario considerar que el intervalo de concentraciones en que los autores han hecho esos estudios no ha sido suficientemente amplio, Moczydlowsky y cols. (1984 a y b) y Behrens y cols. (1989) no hicieron el estudio a concentraciones sobre los 500 mM de Na^+ , en el que la probabilidad de estar doblemente ocupado comienza a ser significativa. Por otra parte, Green y cols. (1987a) no trabajaron a concentraciones menores que 20 mM de Na^+ en que, dadas las características del sistema de conducción del canal, es posible discriminar entre modelos de conducción con ocupación múltiple y modelos con ocupación sencilla y carga superficial (ver discusión, sección 4.1).

Otra explicación para la discrepancia consiste en que el canal modificado por BTX tenga un sistema de conducción iónica cualitativamente distinto que el canal no modificado. Sin embargo, Correa y cols., (1990), en un estudio comparativo de los canales modificado y no modificado por BTX, encontraron que la relación de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ para ambos canales exhibe saturación, y la razón entre las dos conductancias se mantiene relativamente constante en el intervalo 15-1000 mM. Estos resultados sugieren que los cambios en el sistema de conducción

Inducidos por la aplicación de BTX residen fundamentalmente en cambios en la amplitud de las barreras de energía del sistema de conducción (ver discusión, sección 4.3). Por otra parte, la selectividad iónica, determinada a partir de mediciones de los potenciales de inversión, se encuentra modificada (Hille, 1984). Sin embargo, dado que el canal puede alojar a más de un ion simultáneamente, las permeabilidades que se obtengan para distintos cationes dependen de las concentraciones iónicas usadas y del lado del canal en el que se ponga el catión de prueba (intracelular o extracelularmente; Garber, 1988).

Para aclarar la discrepancia, es necesario hacer las mediciones de conductancia en un intervalo amplio de concentraciones de sodio, y además, encontrar una condición experimental en la que sea posible demostrar la ocupación múltiple del canal modificado por BTX (ver sección 1.2.1.2).

En el estudio comparativo entre canales modificados y no modificados por BTX de Correa y cols. (1990), se observó que, a concentraciones bajas de sodio, la conductancia de los canales es mayor que la esperada para un sistema de barreras de energía con ocupación simple. Los autores, propusieron que en la cercanía de las bocas del canal existen cargas negativas fijas que concentran cationes a la entrada de él, así, la concentración local de iones sodio es mayor que en el seno de la solución. Sin embargo, de estos experimentos, no es posible determinar si estas cargas fijas están en la superficie del canal o de los lípidos presentes en la membrana del axón. Para responder esta clase de preguntas es necesario estudiar el canal incorporado a una membrana de lípidos neutros, es decir, en un sistema artificial con lípidos de una constitución conocida. Por otra parte, la forma de la relación de conductancia vs. $[Na^+]$, también puede ser explicada si el sistema de conducción de ambos canales puede alojar más de un ion simultáneamente.

El alto grado de glicosilación del canal de sodio implica suponer que en su superficie existen cargas negativas fijas. Sin embargo, en el canal de sodio, el efecto de las cargas de superficie sobre la conducción iónica no está tan bien documentada como en el caso del canal de potasio activado por calcio (ver sección 1.2.1.3). Así, en el canal de sodio de cerebro de perro

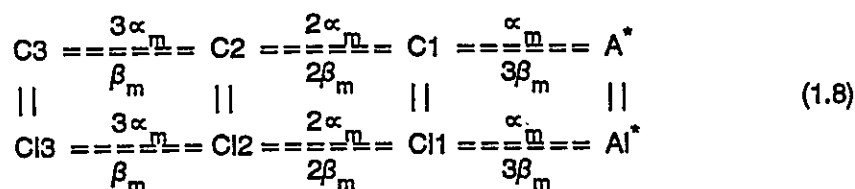
incorporado a bicapas de lípidos en presencia de BTX se observó que el tetrametiloxonio (TMO); que metila grupos carboxilos, reduce la conductancia unitaria en un 37% (Worley y cols., 1986), sin embargo, estos resultados también pueden ser explicados suponiendo que el TMO estabiliza una conformación menos conductora de la proteína. En efecto, Levinson y cols. (1990), en las mismas condiciones experimentales, encontraron que el tratamiento con neuraminidasa (que desprende los ácidos siálicos) induce la aparición de conformaciones de distinta conductancia en los canales de sodio de electropilaca de anguila, pero persiste el estado de conductancia correspondiente a los canales no tratados con neuroaminidasa.

1.3.4 Propiedades cinéticas del canal de sodio modificado por BTX

Cuando Armstrong y cols. (1973) descubrieron que el proceso de inactivación de las corrientes de sodio era eliminado después del tratamiento con pronasa (sección 1.1), observaron que la cinética de apertura y cierre no era modificada por esta enzima proteolítica. Por otro lado, en axones tratados con pronasa, no se produce inmovilización de cargas (Tanguy y Yeh, 1988). Por esta razón, para los canales modificados de esta manera el esquema cinético (1.6) se simplifica a la rama superior que no incluye inactivación,

$$C3 \xrightleftharpoons[\beta_m]{3\alpha} C2 \xrightleftharpoons[2\beta_m]{2\alpha} C1 \xrightleftharpoons[3\beta_m]{\alpha} A^* \quad (1.7)$$

En los axones tratados con BTX, la inmovilización de cargas persiste. Esto llevó a Tanguy y Yeh (1988) a proponer que la BTX se une al sitio cargado negativamente que queda expuesto cuando el canal se abre, pero que no bloquea la vía de conducción. Por lo tanto, el efecto de la BTX sería convertir el estado inactivado en un estado abierto (conductor). Así, el esquema cinético para los canales modificados por BTX sería el siguiente:



en que existen dos estados conductores A^* y AI^* .

En un registro de canales únicos, es posible medir la duración de cada tiempo de permanencia en cada una de las visitas a los estados abierto y cerrado. Para establecer un modelo cinético que de cuenta de un registro de canal único es necesario medir las duraciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado. En un modelo cinético de primer orden como los esquemas 1.3 y 1.4, las duraciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado se distribuyen exponencialmente (Ehrenstein y cols., 1974). Cuando la distribución de los tiempos de permanencia en alguno de los estados no sigue un comportamiento monoexponencial, es necesario suponer un modelo más complejo que el planteado en el esquema cinético 1.4. Así, un esquema cinético dado tiene, a lo menos, tantos estados cerrados como componentes tenga la distribución de los tiempos de permanencia en el estado cerrado del registro (Colquhoun y Hawkes, 1981; 1983; Alvarez, 1986).

Sin embargo, para distribuciones que poseen muchos componentes, existen muchos esquemas cinéticos que pueden dar cuenta de ellas. Así, para determinar qué esquema cinético da cuenta de las características de uno o más registros de corriente es necesario usar otros criterios. Uno de estos criterios es analizar la historia del registro de corriente (Montal y cols., 1984; Labarca y cols., 1985), por ejemplo, medir el tiempo promedio de todas las visitas al estado abierto con que terminó un evento cerrado dado. De esta manera es posible encontrar correlaciones entre la duración de los eventos cerrados y sus abiertos adyacentes (Fredkin y cols., 1985; McManus y cols., 1985; Kerry y cols., 1988). Usando este criterio ha sido posible plantear esquemas cinéticos para los canales de potasio activado por calcio y de cloruro de mioblasto (Blatz y Magleby, 1986b; 1989) y el canal receptor de acetilcolina (Labarca y cols., 1985).

En un registro de canales individuales de sodio, en los que es posible medir las duraciones de los tiempos de permanencia en los estados abiertos y cerrados, las predicciones de los modelos cinéticos para los canales tratados con pronasa (esquema 1.7) y los canales tratados con BTX (esquema 1.8) debieran ser totalmente distintas: En primer lugar el esquema 1.7 predice que el canal tiene un solo estado abierto, en cambio el esquema 1.8 predice la existencia de dos

estados abiertos. Por otra parte, en el esquema cinético 1.8 A^* y AI^* , pueden ser abandonados saliendo preferentemente a $C1$ y $C11$ respectivamente. Entonces, en un análisis de las duraciones de los tiempos de permanencia, si medimos la duración de un evento abierto correspondiente a A^* , es muy probable que el evento cerrado consecutivo pertenezca al estado $C1$, por lo tanto, se observará la existencia de correlación entre las duraciones de eventos abiertos y cerrados adyacentes (McManus y cols., 1985; Blatz y Magleby, 1986b; 1989; Kerry y cols., 1988). En cambio, el esquema cinético 1.7 no predice ningún tipo de correlación entre las duraciones de los abiertos y de los cerrados adyacentes, pues, el estado abierto es abandonado siempre hacia el mismo estado cerrado ($C1$).

1.5 Objetivos

Con el objetivo de entender el mecanismo de acción de la BTX sobre el canal de sodio, en esta tesis se estudió el sistema de conducción y las propiedades cinéticas del canal de sodio modificado por BTX del músculo esquelético de la rana chilena *Caudiververa caudiververa*.

Este proyecto se desarrolló incorporando los canales de sodio de los túbulos transversales del músculo esquelético de la rana a bicapas de lípidos. El trabajo consistió en:

- Establecer un modelo de conducción iónica a través del canal, en particular determinar si, al igual que el canal no tratado con BTX, el canal modificado puede ser ocupado por más de un ion a la vez.
- Establecer un modelo cinético para el canal modificado por BTX, en particular discriminar entre los dos modelos 1.7 y 1.8 y determinar las constantes cinéticas dependientes del voltaje. Estas determinaciones permiten entender de qué manera el sistema de compuertas del canal es modificado por la toxina.
- Determinar si existen grupos cargados en la superficie de la proteína que puedan producir un potencial de superficie que afecte tanto las constantes cinéticas de transporte de iones como las constantes cinéticas del proceso de apertura y cierre.

1.5.1 ¿ Porqué *Caudiververa caudiververa* ?

A pesar que la mayor parte de los estudios de corrientes macroscópicas de sodio en el músculo esquelético se ha llevado a cabo en fibras musculares de rana (Hille, 1984), a nivel de canales individuales de sodio es poco lo que se sabe. Más aún, los estudios que se han hecho en canales de sodio se han llevado a cabo con canales de músculo y cerebro de rata (Krueger y cols., 1983; French y cols., 1986a; 1986b; Moczydlowsky y cols., 1984), cerebro de perro (Green y cols., 1987a; 1987b, 1990) y nervio óptico de calamar (Behrens y cols., 1989). Por esta razón un objetivo adicional de este trabajo fue complementar la información disponible en torno a los canales de sodio del músculo esquelético de la rana, y comparar el comportamiento de este canal en bicapas artificiales con los otros mejor conocidos a nivel individual pero menos estudiados a nivel macroscópico.

1.5.2 ¿ Porqué las bicapas ?

En este trabajo, para caracterizar el sistema de conducción del canal de sodio modificado por BTX, es necesario estudiar la conductancia unitaria del canal en función de la concentración de sodio en el intervalo de concentraciones de 0,4-3000 mM. Estas mediciones no se hubieran podido hacer con los canales en su membrana nativa, pues, técnicamente es muy difícil manipular las concentraciones iónicas, en el intervalo señalado, en el interior y exterior de una pipeta de patch clamp. Por otra parte, para estudiar el efecto de grupos cargados en la superficie del canal sobre la conducción y sobre la cinética, es necesario estar seguro de que los lípidos en los que el canal está presente son neutros en las condiciones experimentales en que se hace el estudio.

En este trabajo se utilizó la técnica de incorporación a bicapas, pues, ella permite controlar simultáneamente el medio ambiente lipídico que rodea al canal y las soluciones que bañan ambas caras de él (celular y extracelular). Ejemplos notables de las potencialidades de esta técnica son la incorporación a bicapas de los canales de potasio y de calcio del retículo sarcoplasmático de vertebrados (Miller y Racker, 1976; Coronado y Miller, 1979; Smith y cols., 1985; Suarez-Isla y cols., 1988), de los canales de sodio (Krueger y cols., 1983) y potasio activado por calcio (Vergara, 1983;

Latorre y cols., 1982).

Para incorporar canales en bicapas es requisito poseer preparaciones de membranas altamente purificadas que contengan los canales que se quiere estudiar. Actualmente existe una preparación de membrana plasmática de músculo esquelético de rana que ha sido de gran importancia en este trabajo, esta es una fracción altamente purificada en membrana de túbulos transversales (Roseblatt y cols., 1981; Hidalgo y cols., 1986; ver métodos).

2.- METODOS

La metodología experimental consiste en incorporar canales de sodio en bicapas de lípidos por fusión de vesículas de membrana de túbulos transversales de músculo esquelético de *Caudiverbera caudiverbera*. Los canales se activan con BTX, se someten a distintos niveles de voltaje y se registra la corriente que pasa a través de ellos.

2.1 Obtención de membranas de túbulos transversales.

El método ha sido descrito en detalle por Hidalgo y cols. (1986). Se disectan las patas posteriores y anteriores 3,4 o 5 ranas adultas obteniendo entre 100 a 150 g de músculos. Se retiran nervios y tejido adiposo visibles y se tritura en un procesador de alimentos. Posteriormente, el tejido es homogeneizado en una juguera suspendido en cuatro volúmenes de KCl 100 mM (*p.a.* Merck), Tris-maleato 20 mM pH 7 (Sigma Chem.). El homogeneizado es sometido a una centrifugación a 10.000 g por 30 min (centrífuga Sorvall Mod. RC2-B; rotor GSA). Se recoge el sobrenadante (que contiene organelos, vesículas de membranas y proteínas contráctiles). Con el propósito de solubilizar las proteínas contractiles (que tienden a aglomerarse), al sobrenadante se le agregan cristales de KCl hasta una concentración final de 600 mM. El sobrenadante es sometido a una centrifugación a 100.000 g por 60 min en una ultracentrífuga Beckmann Mod. L, usando un rotor 30. El sedimento, que contiene organelos y vesículas de membrana, se recoge, es resuspendido en 50 ml de KCl 100 mM, Tris-maleato 20 mM pH 7 y se centrifuga a 100.000 g por 60

min. El sedimento se recoge y se resuspende en 15 ml de sacarosa (ultra pura, Fluka) 280 mM, Tris-maleato 20 mM a pH 7. La suspensión se somete a centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa a 100.000 g durante 12-16 h en un rotor de ángulo variable (Beckmann, Mod. SW-25). El gradiente discontinuo de sacarosa se forma poniendo cuatro capas con soluciones de sacarosa de concentraciones de 25%, 27,5%, 35% y 50% (p/v) respectivamente en tubos de 30 ml de capacidad. Se recoge la fracción que se equilibra sobre la capa 27,5% (aprox. 10 ml por tubo). Esta fracción, que está altamente enriquecida en membranas de túbulos transversales, es diluída con Tris-maleato 20 mM, pH 7 hasta que la concentración de sacarosa quede a un valor cercano a 300 mM, luego se centrifuga a 100.000 g por 60 min. Se recoge el sedimento y se resuspende en 1 ml de sacarosa 300 mM Tris-maleato 20 mM pH 7. La concentración de proteína, determinada con el método Lowry (Hartree, 1972), es de 1-4 mg/ml. La preparación se divide en fracciones de 30 μ l que se congelan usando una mezcla de acetona-hielo seco y se almacenan a -80 °C para su uso posterior.

En las preparaciones hechas en presencia de inhibidores de proteasas, la homogeneización en la juguera se desarrolló en una solución de KCl 100 mM, Tris-maleato 20 mM pH 7, leupeptina 0,4 μ g/ml (Fluka), pepstatina A 0,4 μ g/ml (Fluka), benzamidina 0,4 mM (Fluka), y PMSF (Sigma) 1 mM.

2.2 Montaje Experimental y formación de bicapas

Las bicapas de lípidos se forman en una cámara de Teflon de dos compartimientos separados por una lámina de Teflon de 17 μ m de espesor con una perforación de 300 μ m. Ambos compartimientos contienen 3 ml de soluciones de NaCl tamponadas con Mops-NaOH 5mM pH 7. La bicapa se forma siguiendo el procedimiento descrito por Mueller y cols. (1963). Ella se forma depositando, con una bagueta de vidrio, una solución de fosfatidiletanolamina (Avanti Polar Lipids) 10 mg/ml en decano sobre el orificio. La corriente que pasa a través de la bicapa es medida con un amplificador operacional de alta impedancia de entrada configurado como conversor corriente-voltaje (Alvarez y cols., 1986). La entrada inversora de este amplificador es conectada a través de

un electrodo de Ag/AgCl a uno de los compartimientos de la cámara (lado *trans*). Los potenciales son aplicados por un generador de funciones conectado a través de un electrodo de Ag/AgCl con el otro compartimiento (lado *cis*). La formación de la bicapa se visualiza en un osciloscopio como la señal capacitiva transitoria producida en respuesta a un pulso cuadrado de voltaje de 5 mV, pues, la integral de la corriente de la respuesta entre la fase de subida y la fase de bajada del pulso cuadrado es proporcional a la capacidad eléctrica de la bicapa. Todos los experimentos se desarrollaron con bicapas con capacidades de 100-400 pF. La señal de corriente es digitalizada (14 bits @ 44.000 muestras por s) con un procesador digital de audio (Technics, Mod. SV-100) modificado por el Sr. Juan Espinoza para que tenga una respuesta de frecuencias en el intervalo DC - 20 kHz. La señal se graba en cinta magnética en formato digital por una videogradora (National, Mod. NV-G9PN).

Después de verificar la formación de la bicapa y antes de intentar la incorporación de canales, se agrega al lado *cis* 3 μ l de una solución BTX 100 μ M en etanol.

2.3 Protocolos de incorporación.

Para facilitar la incorporación de canales generalmente se usó un gradiente osmótico de NaCl en el cual el lado con mayor concentración de la sal era el lado *cis*. Sin embargo, el tipo de gradiente osmótico usado dependía de la clase de protocolo experimental (ver abajo). La preparación de membranas se agregó al lado *cis* hasta una concentración final de proteína de 1-10 μ g/ml. La incorporación de canales se visualizó en el osciloscopio por las fluctuaciones de la corriente a través de la bicapa que son características de las transiciones entre el estado abierto y cerrado del canal.

Para estudiar las características del sistema de conducción se desarrollaron tres familias de protocolos experimentales: protocolos para medir la conductancia de los canales a distintas concentraciones de sodio, protocolos para medir la selectividad y protocolos para medir el efecto de la fracción molar Na-Li sobre la conducción del canal. En todos los casos y a menos que se indique algo distinto, pH de las soluciones fue fijado con Mops 5 mM titulado con el hidróxido del

cación de prueba a pH 7.

2.3.1 Protocolos diseñados para medir la conductancia de los canales a distintas concentraciones de sodio.

Todos estos experimentos fueron hechos con concentraciones simétricas de sodio a ambos lados de la cámara. Sin embargo, debido a la gran amplitud del intervalo de concentraciones de sodio estudiado, fué necesario diseñar cuatro tipos de protocolos de incorporación de canales, según la concentración de Na^+ que se quería estudiar. Los protocolos se describen a continuación.

2.3.1.1 Experimentos en altas concentraciones de sodio (1-3 M).

En estos casos los canales se incorporaron en presencia de una concentración de NaCl de 1 ó 3 M en ambos lados de la cámara.

2.3.1.2 Experimentos a concentraciones intermedias de sodio (0,2-0,5 M).

En estos experimentos se usa un gradiente osmótico con 400 mM NaCl en el lado *cis* y 200 mM NaCl en el lado *trans*. Las vesículas de membrana se agregan en el lado *cis*. Después de la incorporación de canales, se igualan ambas concentraciones, ya sea, perfundiendo el lado *cis* con 10 volúmenes de la solución de 200 mM NaCl ó agregando un volumen adecuado de NaCl 3 M en el lado *trans*, de tal manera de llevar la concentración de NaCl en este lado a 400 mM.

2.3.1.3 Experimentos a concentraciones bajas de sodio (2,2-60 mM).

El gradiente osmótico se establece poniendo una solución de 200 mM NaCl en el lado *cis* de la cámara y una solución de Mops-NaOH 5 mM, pH 7 en el lado *trans*. Después de verificar la incorporación de canales de sodio se igualan ambas concentraciones perfundiendo el lado *cis* con 10 volúmenes de Mops-NaOH 5 mM pH 7 bajo agitación. La concentración promedio de sodio en la solución de Mops-NaOH 5 mM, pH 7 es 2,2 mM ($n=3$), determinada usando un espectrofotómetro

de absorción atómica (Perkin-Elmer/360). Para cambiar la concentración de sodio hasta un valor definido, se agregó a ambos lados un volumen adecuado de una solución de NaCl 3 M.

2.3.1.4 Experimentos a concentraciones muy bajas de sodio (0,4-1 mM).

El gradiente osmótico se fija poniendo una solución de 200 mM NaCl, Mops-NaOH 5 mM pH 7 en el lado *cis* de la cámara. En el lado *trans* se pone una solución de Mops-NaOH 1 mM pH 7. Después de verificar la incorporación de canales de sodio se igualan ambas concentraciones perfundiendo el lado *cis* con 10 volúmenes de Mops-NaOH 1 mM pH 7 bajo agitación. La concentración de sodio en la solución de Mops-NaOH 1 mM, pH 7 determinada espectrofotométricamente es de 0,4 mM ($n=2$) mM. Para obtener la concentración de sodio que se quería estudiar, se agregó a ambos lados un volumen adecuado de una solución de NaCl 200 mM. Debido a la baja concentración del tampón, al final de estos experimentos se midió el pH. El valor promedio en 4 determinaciones de pH fué 6,9 con valores mínimo y máximo de 6,8 y 7,2 respectivamente.

2.3.2 Protocolos diseñados para medir la selectividad a cationes alcalinos.

En todos estos experimentos la incorporación de canales se hace en una solución 200 mM NaCl en ambos lados de la cámara. Después de verificar la incorporación de canales se somete a un protocolo de voltajes para medir la conductancia del canal y la diferencia de potencial entre los electrodos (ver sección 2.4.1). Para establecer la condición biliónica se perfunde el lado *cis* con 10 volúmenes de una solución de 200 mM LiCl (o CsCl).

En estos experimentos, el potencial eléctrico aplicado es corregido por el potencial de unión líquida (Robinson y Stokes, 1965). Para las condiciones biliónicas, LiCl/NaCl y CsCl/NaCl, los potenciales de unión líquida calculados son 2,4 y 5,0 mV, respectivamente.

2.3.3 Protocolos diseñados para determinar el efecto de la fracción molar Na-Li sobre la conducción.

Se define fracción molar Na-Li, f , como: $f = [\text{Na}^+] / ([\text{Na}^+] + [\text{Li}^+])$.

Para determinar el efecto de la fracción molar, f , sobre la conducción era necesario hacer variar gradualmente f entre 0 y 1, sin embargo, técnicamente, es muy difícil cambiar gradualmente la fracción molar f en ambos compartimientos desde 1 hasta 0 durante un mismo experimento, por esta razón, después de la incorporación de canales y de aplicar un protocolo de voltajes para medir la conductancia del canal en 200 mM NaCl, se procedió de las dos maneras que se describen a continuación:

2.3.3.1 Determinación de la conductancia cuando f es cercana a 1.

Los cambios en f para medir la conductancia comenzaron a partir de la condición 200 mM NaCl en ambos lados de la bicapa. La fracción molar f se cambia reemplazando 0,2 ml de solución de ambos compartimientos de la cámara por 0,2 ml de LiCl 200 mM. Después de cada cambio en la fracción molar, se mide la corriente ha través del canal a diferentes voltajes.

2.3.3.2 Determinación de la conductancia cuando f es cercana a 0.

Después de determinar la conductancia en NaCl 200 mM simétrico, se perfunden ambos compartimientos de la cámara con 10 volúmenes de LiCl 200 mM y se aplica un protocolo de voltajes para medir la conductancia del canal en estas condiciones. La fracción molar f se cambia reemplazando 0,2 ml de solución de la cámara por 0,2 ml de NaCl 200 mM. Después de cada cambio en la fracción molar, se mide la corriente ha través del canal a diferentes voltajes.

2.4 Protocolos de voltajes y orientación de los canales incorporados.

2.4.1 Experimentos de conducción.

En todo este estudio el protocolo de voltajes era el mismo. Este comenzaba con la aplicación de voltajes pequeños de distinto signo ($\pm 5-20$ mV) a través de la bicapa. El valor

absoluto del potencial es incrementado en saltos de 5-20 mV. Dado que la estabilidad de la bicapa, después de la incorporación, depende fuertemente de la amplitud del potencial aplicado y de la historia de potenciales aplicados a través de ella, la bicapa se rompe más fácilmente cuando es, o ha sido, sometida a potenciales altos (cerca de ± 100 mV). Por lo tanto, la amplitud del intervalo de voltajes explorado es muy variable y dependía de la estabilidad de la membrana. El menor y mayor intervalo de voltajes explorado fue ± 30 y ± 150 mV respectivamente. El tiempo durante el cual se aplicó un valor de voltaje determinado fue el mínimo necesario para detectar a lo menos 5 transiciones en la corriente que pasa a través del canal.

Para inducir fluctuaciones del canal en aquellos potenciales en los cuales la probabilidad de estar abierto es máxima se usó dc-STX que induce cierres del canal por tiempos que pueden durar varios segundos (Moczydlowsky y cols. 1984). La concentración usada depende de la concentración del catión alcalino presente, pues esta toxina, y las demás toxinas de la familia de la STX, muestran un tipo de inhibición competitiva con el sodio (Moczydlowsky y cols., 1984, Green y cols. 1987b). Para ejemplificar, las concentraciones de dc-STX usadas fueron 0,6, 3 y 30 nM cuando las concentraciones de Na^+ son 0,4, 200 y 3000 mM respectivamente.

2.4.2 Experimentos de cinética.

Los canales de sodio modificados por BTX poseen una cinética dependiente del potencial. El intervalo de voltajes donde es posible observar el mayor efecto del potencial sobre la cinética está entre -130 a -50 mV. En este intervalo de voltajes, el canal transita entre los estados cerrado y abierto centenas de veces por segundo (Worley y cols., 1983; Huang y cols., 1984; Moczydlowski y cols., 1984; Behrens y cols., 1989). El protocolo de voltaje aplicados en estos experimentos consiste en aplicar -100 mV durante el tiempo necesario para coleccionar a lo menos 500 transiciones. Luego se cambia de voltaje en saltos de $\pm 7,5$ o ± 10 mV. Los tiempos de aplicación de los potenciales se encuentran en el intervalo de 10 s a 5 min, y el número de transiciones coleccionadas oscila entre 500 y 8000.

2.4.3 Orientación de los canales incorporados.

La probabilidad de encontrar el canal abierto (P_o) depende del potencial eléctrico aplicado, por tanto, la orientación con que los canales son incorporados a la bicapa se determina observando cómo cambia P_o con el potencial aplicado. Así, canales con orientaciones opuestas, exhiben dependencias del potencial opuestas. En todos los resultados que se muestran en esta tesis se ha seguido la convención electrofisiológica, es decir, se ha hecho corresponder el lado extracelular del canal con 0 mV.

2.5 Análisis de resultados experimentales.

2.5.1 Conducción iónica.

2.5.1.1 Obtención de curvas I-V y cálculo de conductancias.

Todos los registros son filtrados con un filtro pasa bajos de respuesta Bessel de 8 polos (Frequency Devices Mod. 902) a una frecuencia de corte (-3 dB) que varía entre 8 y 20 Hz. Para medir las corrientes unitarias se usaron dos estrategias: una de ellas consiste en digitalizar el registro a 1000 muestras/s con una interface análogo-digital (Axon Instruments, Mod. TL-1) e ingresaría a la memoria de un computador (tipo IBM AT). En el computador está implementado un programa de análisis cuyo código original fué suministrado por el Dr. Francisco Bezanilla y modificado por el Dr. Osvaldo Alvarez para funcionar con el equipo existente en el laboratorio. El programa permite señalar los estados abierto y cerrado y hacer histogramas de amplitudes. La segunda estrategia consiste en desplegar los registros en un registrador de papel termosensible (General Scanning Inc. Mod. RS2-5P) y se mide la corriente directamente del papel. La corriente que pasa a través del canal se mide como la diferencia entre el promedio estimado a ojo de la corriente cuando el canal está abierto y el promedio de la corriente cuando él está cerrado. Con ambos métodos se pueden resolver corrientes de hasta 0,1 pA a 8 Hz (-3 dB).

La conductancia de los canales en cada condición se calcula a partir de la pendiente de una recta ajustada a los valores de corriente medidos a distintos potenciales aplicados.

2.5.1.2 Ajuste de curvas.

Para hacer el ajuste de las relaciones corriente voltaje en condiciones biiónicas y de las curvas de conductancia vs. $[Na^+]$, se usó el programa AJUSTE escrito en FORTRAN (Alvarez y cols., 1991). Este programa posee una función que calcula el la corriente iónica a través del canal a partir de un modelo de barreras de energía (ver sección 2.5.1.3). El modelo usado estaba compuesto de tres barreras y dos pozos de energía. El modelo también incorpora otros dos caracteres como, la posibilidad de ocupación por más de un ion simultáneamente (sección 2.5.1.3.1) y el efecto de cargas negativas en las bocas del canal que puedan producir un potencial local superficial (sección 2.5.1.3.2). El programa evalúa la suma de cuadrados de la diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. Para ajustar las curvas, el programa minimiza la suma de cuadrado con el algoritmo de Gauss-Newton.

El programa AJUSTE permite cambiar la función que calcula de esta manera fué posible alterar el programa para que ajuste una isoterma de inhibición como la descrita en la sección 2.5.1.4.

2.5.1.3 Modelo de barreras de energía.

El flujo iónico desde un sitio (o pozo) a otro en la vía de conducción del canal es proporcional a la fracción de iones que poseen una energía libre mayor que la de la barrera que separa ambos sitios. La constante k_{ij} de rapidez de transporte desde un sitio I a otro sitio adyacente J se relaciona con la diferencia entre la energía libre del pozo en que se encuentra el ion (G_p) y la energía libre el pico de la barrera que separa ambos sitios (G^*):

$$k_{ij} = A \exp(- (G^* - G_p) / RT), \quad (2.1)$$

en que T es la temperatura absoluta y R es la constante de los gases. La constante de proporcionalidad A es un término que proviene de la mecánica estadística y depende de los grados de libertad de traslación, de rotación y vibración de los iones que se encuentran en la vía de conducción. Así,

$$A = kT/h,$$

en que k y h corresponden a las constantes de Boltzmann y Plank respectivamente, se llama factor de frecuencia y a temperatura ambiente equivale a $\approx 10^{11} \text{ s}^{-1}$ (Hille, 1975a).

Para una partícula cargada como lo es un ión, la energía libre depende del potencial eléctrico aplicado (V), por lo que el valor de energía de los pozos y las barreras para un ion determinado puede subir o bajar de acuerdo al signo y la amplitud del campo eléctrico. Por lo tanto podemos escribir:

$$G^* - G_p = G^*_{(V=0)} - G_{p(V=0)} + zF(V^* - V_p), \quad (2.2)$$

en que z es la valencia del ión, F es la constante de Faraday, $G^*(V=0)$ y $G_p(V=0)$ son las energías libres del pico y del pozo, respectivamente cuando $V=0$. V^* y V_p son los voltajes en el pico y en el pozo, respectivamente. Puesto que $V^* - V_p$ es una fracción del potencial que cae a lo largo de toda la vía de conducción del canal, podemos escribir $V^* - V_p = \delta V$. Solamente si el campo eléctrico es constante a lo largo del canal, δ significa una distancia física. Entonces, el flujo iónico entre los sitios I y J (J_{IJ}) estará dado por el producto entre la constante de rapidez k_{IJ} y la probabilidad (P_I) de que el sitio I esté ocupado por el ión:

$$J_{IJ} = P_I k_{IJ}. \quad (2.3)$$

P_I se calcula solucionando un sistema de ecuaciones que contiene todas las contribuciones parciales de flujo de todos los otros sitios de la vía de conducción que afectan a P_I . La solución en régimen estacionario del sistema de ecuaciones se obtiene suponiendo además que:

$$P_\phi + \dots + P_I + P_J + \dots = 1, \quad (2.4)$$

en que P_ϕ es la probabilidad de que ninguno de los sitios esté ocupado. Además, en los extremos de la vía de conducción, las constantes de rapidez de acceso al canal son proporcionales a la concentración del catión en las bocas de él (ver sección 2.5.1.3.3).

Procediendo de la misma manera descrita anteriormente es posible plantear una ecuación de flujo en dirección contraria (J_{JI}). Este flujo J_{JI} lleva signo opuesto, así, el flujo neto es la diferencia entre los flujos en direcciones opuestas.

$$J = J_{IJ} - J_{JI} \quad (2.5)$$

Por tanto, de las ecuaciones 2.1 y 2.2 es claro que el sentido del flujo neto cambia según el

potencial eléctrico aplicado.

Puesto que los iones son cargados, el movimiento de ellos genera una corriente eléctrica. Por lo tanto, a partir del cálculo del número de cargas desplazadas por unidad de tiempo se obtiene la corriente que pasa a través del canal.

El sistema de barreras que se usó para describir los datos posee dos sitios de unión y tres barreras de energía, dos barreras de acceso y una central que separa ambos sitios (ver figura 3.14). Por lo tanto, los parámetros ajustables són: la altura de las tres barreras de energía, la profundidad de los pozos y la distancia fraccional a la que se encuentra cada uno de estos componentes del modelo de barreras en la vía de conducción.

Para el modelo usado, el programa AJUSTE incorpora otras dos características, estas son la posibilidad de ocupación múltiple, y la presencia de cargas fijas negativas que generan un potencial superficial local.

2.5.1.3.1 Modelos de barreras con ocupación múltiple.

Si el sistema de conducción del canal está ocupado por un ión, debido a la repulsión electrostática, la probabilidad de que un segundo ion ingrese a la vía de conducción es muy baja. En el programa AJUSTE, la probabilidad de ocupación doble se especifica con un parámetro único de interacción entre los dos iones. Este parámetro establece que el incremento en el valor de energía en cualquier punto del sistema de conducción es inversamente proporcional a la distancia eléctrica desde ese punto a la posición del sitio ocupado. Cuando el sitio I es ocupado por un ión, la energía libre para un segundo ion en cualquier punto x de la vía de conducción (G_{xi}) es:

$$G_{xi} = G_{xo} + A_{X-Y} / \delta_{xi} \quad (2.6)$$

en que G_{xo} es la energía libre en el punto x para el primer ion, δ_{xi} es la distancia eléctrica entre el punto x de la vía de conducción y el sitio ocupado I, A_{X-Y} es el parámetro de interacción y corresponde al incremento de energía cuando ambos iones, X e Y, ocupan el canal separados por una distancia eléctrica igual a uno. Notemos que si A_{X-Y} es cercano a cero la repulsión es casi nula y el canal puede ser fácilmente ocupado por dos iones simultáneamente. Por otra parte, si A_{X-Y} es

muy grande la repulsión es muy grande y el canal solo puede ser ocupado por un ión.

2.5.1.3.2 Modelos de barreras y potencial de superficie.

Para calcular el efecto de un potencial local generado por cargas negativas fijas en la boca del canal sobre la conducción, se usó la teoría de Gouy-Chapman (Grahame, 1947) aplicada a iones monovalentes.

Cuando la superficie del canal es cargada, se produce un campo eléctrico que afecta la distribución de iones en la cercanía del canal concentrando en las bocas del canal iones de signo opuesto. La concentración superficial se calcula suponiendo que la concentración iónica en la cercanía del canal (C) sigue una distribución de Boltzmann,

$$C = C_o \exp (-zF\phi / RT), \quad (2.7)$$

en que z , F , R y T tienen sus significados usuales, C_o es la concentración molar del ion en el seno de la solución, ϕ es el potencial generado por las cargas en la superficie del canal y se calcula como (Grahame, 1947):

$$\phi = (2RT/F) \operatorname{senh}^{-1} (-1,36 \sigma / \sqrt{C_o}), \quad (2.8)$$

en que σ es la densidad de carga superficial (en enm^{-2}) se usa como parámetro ajustable. Existen dos parámetros para describir el potencial superficial, uno para el lado interno y otro para el lado externo del canal. Además, para calcular la expresión 2.2, el potencial eléctrico es corregido por la diferencia en el potencial de superficie en ambos lados del canal.

2.5.1.3.3 Cálculo de la actividad iónica de las sales de cloruro.

En vista de que no existe ninguna teoría que describa adecuadamente la relación entre la actividad iónica y la concentración de sales alcalinas de cloruro en el intervalo 0,4-3000 mM (Villarroel y cols., 1991), la actividad iónica de las concentraciones de sales fueron calculada de acuerdo a la siguiente formula empírica (Villarroel y cols., 1991).

$$a = \exp \{ -X_1 M^{1/2} / (1 + X_2 M^{1/2}) \} + X_3 M + X_4 M^2,$$

en que a y M son la actividad iónica y la concentración molar de la sal, X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son

Tabla 2.1

Valores de los coeficientes usados para calcular las actividades iónicas.

	LiCl	NaCl	CsCl
$X_1 (M^{-1/2})$	1,2096	1,1068	0,9985
$X_2 (M^{-1/2})$	1,6066	1,2318	0,4384
$X_3 (M^{-1})$	2,0792	0,8443	1,1956
$X_4 (M^{-2})$	21,3787	11,3406	2,2560

coeficientes específicos para cada sal, los valores de estos coeficientes, para NaCl, LiCl y CsCl se encuentran listados en la tabla 2.1.

En el programa AJUSTE, el cálculo de la concentración iónica efectiva en la superficie cargada del canal (ecuaciones 2.7 y 2.8) se hizo con la actividad iónica. A pesar que desde el punto de vista teórico no es apropiado usar la actividad iónica en las ecuaciones 2.7 y 2.8, la justificación para su uso reside en que a bajas concentraciones iónicas, donde el efecto del potencial de superficie sobre la concentración efectiva es más notable, los valores de la actividad iónica son similares a los de la concentración molar, por otra parte, a alta fuerza iónica es necesario corregir la concentración iónica por actividad.

2.5.1.3.4 Elección de las características básicas del modelo de barreras.

El modelo usado para describir los resultados de conducción iónica se muestra en la figura 3.14, este modelo se confeccionó tomando en cuenta los siguientes criterios:

i.- Para explorar la posibilidad de ocupación doble, el sistema de barreras debe poseer, por lo menos, dos sitios de unión, esto implica que debe poseer al menos tres barreras de energía: dos de acceso y una central que separa los dos pozos de energía o sitios de unión.

ii.- Puesto que a concentraciones de sodio mayores que 10 mM, las relaciones corriente-voltaje tienen la misma forma, tanto a potenciales positivos, como a potenciales negativos, el perfil de barreras debe ser simétrico en torno a la barrera central, además de esto, la altura de las dos barreras de acceso y la profundidad de los dos sitios de unión deben ser iguales.

iii.- A falta de un criterio independiente que nos permita medir la altura de la barrera central, esta fué dejada igual a las barreras de acceso.

iv.- La relación corriente-voltaje en 200 mM LiCl es sublineal (figura 3.16A), es decir, a potenciales grandes, ellas tienden a saturarse sugiriendo que la etapa limitante para el transporte del Li^+ es independiente del voltaje aplicado (Latorre y Miller, 1983). Por esta razón, la posición de los picos de las barreras de acceso al sistema de conducción se dejaron en las posiciones 0 y 1 de la vía de conducción, en estas posiciones ellas no son afectadas por el potencial aplicado.

El modelo de barreras puede incorporar la posibilidad de ocupación doble o sencilla, esto se especifica con el parámetro de repulsión electrostática $A_{\text{Na-Na}}$ (ver sección 2.5.1.3.1). Si $A_{\text{Na-Na}}$ es cero, la repulsión es nula y la probabilidad de ocupación del segundo sitio es igual a la del primero, si $A_{\text{Na-Na}}$ es muy grande, el canal solo puede ser ocupado por un ion. En la práctica, para especificar que el canal puede ser ocupado por un solo ion, el parámetro $A_{\text{Na-Na}}$ fué dejado fijo en 20 kT, esto significa que, dado que uno de los dos sitios está ocupado, la probabilidad de que un segundo ion ocupe el sitio libre se reduce por un factor de 10^{-29} . Para ajustar los datos usando el modelo de barreras con ocupación doble, el parámetro $A_{\text{Na-Na}}$ se dejó como parámetro ajustable.

En el modelo de barreras, la posibilidad de presentar un potencial de superficie generado por cargas fijas negativas en las bocas del canal se especifica con el radio de un círculo (r , en nanómetros) que contiene una carga negativa (ver sección 2.5.1.3.2). Las densidades de cargas, σ , puede ser distinta en ambos lados del canal, así, se hace necesario especificar el parámetro r para ambos lados del canal, r_{in} y r_{ex} , para los lados intra y extracelular, respectivamente. En los ajustes, para especificar que el sistema de conducción del canal no es afectado por cargas negativas en la superficie, los parámetros r_{in} y r_{ex} fueron fijados en 1000 nm, esto da un valor de $\sigma = 3.2 \cdot 10^{-7} \text{ e} \cdot \text{nm}^{-2}$. Esta densidad de carga es $\approx 10^{-6}$ veces más pequeña que las calculadas cuando en el ajuste de los datos se dejó r como parámetro ajustable, además, este valor genera un potencial superficial despreciable en las condiciones experimentales en que se trabajó.

A falta de un criterio experimental para establecer la posición de los sitios de unión de iones dentro de la vía de conducción, se buscó aquella posición que permitiera un mejor ajuste de los resultados experimentales (es decir, una suma de cuadrados menor). La búsqueda de la posición óptima de los sitios de unión se realizó ajustando los datos de la relación conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ para los dos estados de conductancia que se encontraron (gama_1 y gama_2) con distintos valores para la posición de los pozos, estas posiciones tenían la restricción de estar simétricamente dispuestos con respecto a la barrera central. Como resultado de estos cálculos, se determinó que la suma de cuadrados decrece a medida que la posición de los pozos de energía se acercan a la barrera central (figura 2.1). Tanto para gama_1 , como para gama_2 , los valores mínimos de la suma

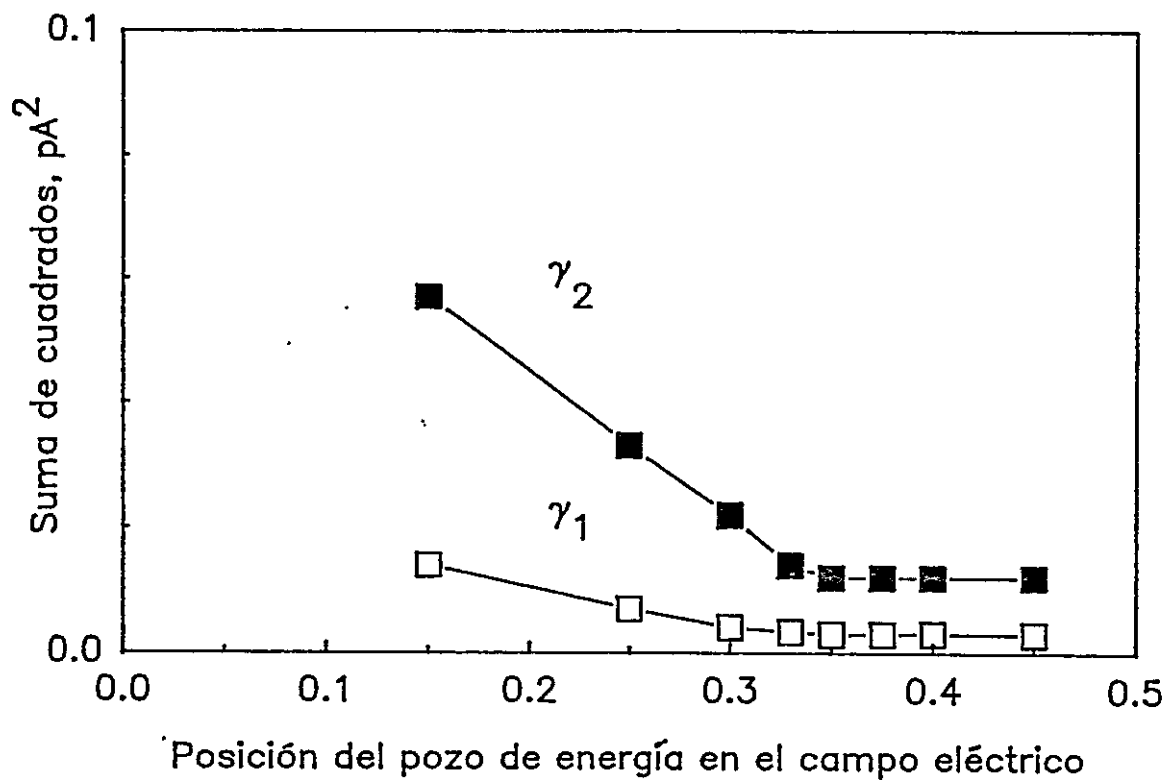


Figura 2.1 Relación entre la bondad del ajuste y la posición de los pozos de energía.

Con la condición de que la posición de los pozos de energía están dispuestos simétricamente en torno a la barrera central, el modelo de barreras que permite doble ocupación y cargas de superficie en las bocas del canal fue ajustado a la relación de conductancia vs. $[Na^+]$ para los dos estados de conductancia γ_{α_1} y γ_{α_2} , cambiando la posición de los pozos de energía. La distancia graficada corresponde a la distancia eléctrica medida desde el lado externo del canal. La ordenada corresponde a los mínimos de la suma de las diferencias al cuadrado entre los valores experimentales y los calculados por el modelo de barreras obtenidos del ajuste de las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$.

de cuadrados se alcanza cuando los pozos se encuentran separados por una distancia eléctrica de 0,3, ellos son 0,0023 y 0,0013 pA², respectivamente.

2.5.1.4 Isoterma de inhibición y carga superficial.

El bloqueo de la corriente en presencia de un ion bloqueador cuya concentración es aumentada en las bocas del canal por la presencia de cargas fijas negativas en su superficie, puede ser descrito con la siguiente expresión (Smith-Maxwell y Begenisich, 1987; Villarroel, 1989):

$$I = I_0 [1 + C(\phi)/K_D]^{-1} \quad (2.9)$$

en que I e I_0 son los valores de la corriente en presencia y en ausencia del ion bloqueador respectivamente, $C(\phi)$ es la concentración en las bocas del canal del ion bloqueador y depende del potencial de superficie (ϕ) según la ecuación 2.7, K_D es la constante de disociación del ion por un sitio dentro del canal.

Para calcular el efecto del potencial de superficie sobre la distribución de un ion bloqueador se usó una forma más general de la aproximación de Gouy-Chapman (Grahame, 1947).

$$\sigma = \pm \{ 2RT\epsilon_0\epsilon_w \sum_i C_i [\exp(-z_i F\phi / RT) - 1] \}^{-1/2}. \quad (2.10)$$

en que σ es la densidad de carga en la superficie del canal, ϵ_0 es la constante de permitividad del vacío, ϵ_w es la constante dieléctrica del agua y C_i representa la concentración de cada una de las especies iónicas en solución.

Para calcular la concentración del bloqueador con la ecuación 2.7, es necesario tener una expresión explícita para el potencial de superficie, sin embargo, la ecuación 2.10 no tiene una solución general para el potencial, por esta razón, es necesario buscar soluciones particulares. Para el ajuste de los datos de la sección 3.2.7.1, la ecuación se resolvió para una solución compuesta de aniones y cationes monovalentes y cationes divalentes. Entonces, $z_i = -1, 1, 2$. Si hacemos $m = 2RT\epsilon_0\epsilon_w$ y $\Phi = \exp(F\phi/RT)$, entonces la ecuación 2.10 queda:

$$\sigma^2 = m \{ [M^-]\Phi + [M^+]\Phi^{-1} + [D^{++}]\Phi^2 - [M^-] - [M^+] - [D^{++}] \}. \quad (2.11)$$

en que $[M^-]$, $[M^+]$, $[D^{++}]$ son las concentraciones del anión y el catión monovalentes y del catión

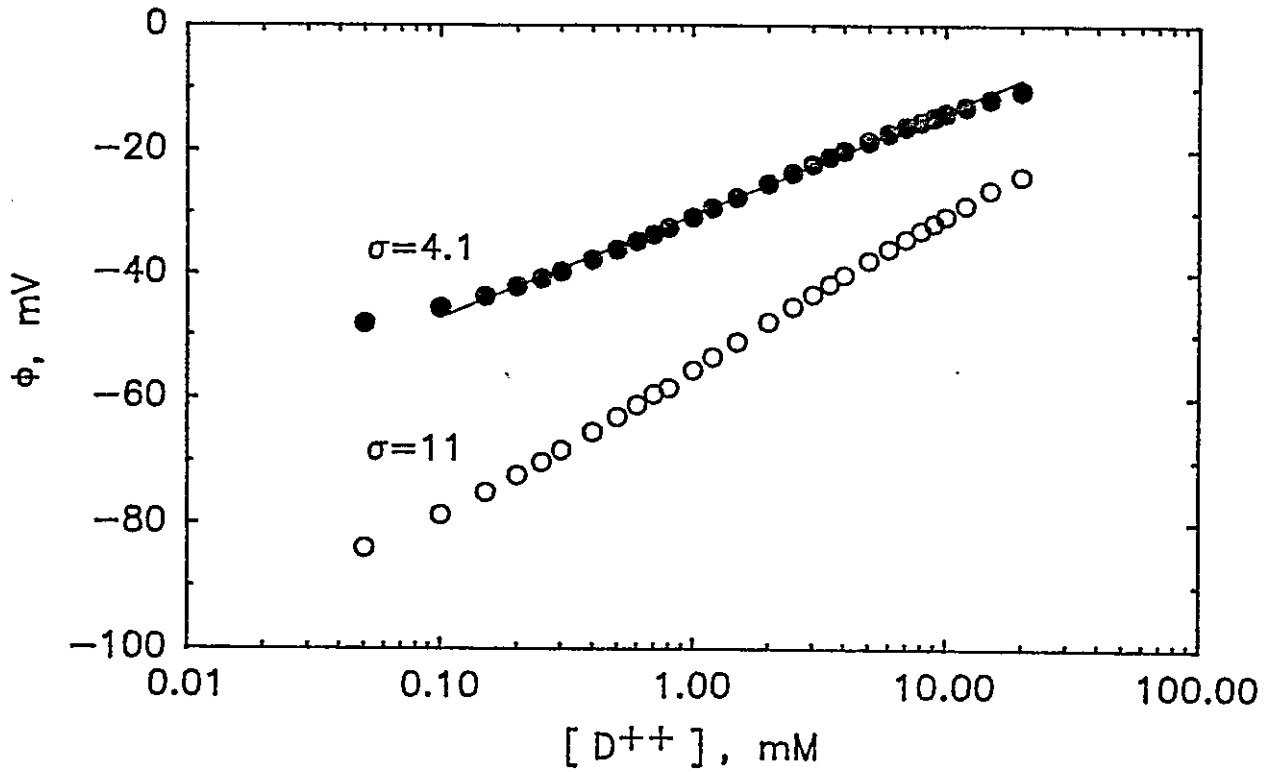


Figura 2.2. ϕ vs. $[D^{++}]$.

Los valores graficados corresponden a las raíces de la ecuación 2.12 obtenidas numéricamente a partir de una planilla de cálculos. Para cada valor de $[D^{++}]$, el procedimiento para calcular el potencial de superficie consiste en asignar iterativamente valores a ϕ y determinar cuando la curva descrita por el polinomio cambia de signo. Este cálculo se hizo para dos valores de σ , 0,041 y 0,11 -enm^{-2} . La línea continua sobre los puntos en $\sigma = 0,041 \text{-enm}^{-2}$ fue trazada con la ecuación 2.13 ajustando los valores de $[D^{++}]$ entre 0,1 y 10 mM.

divalente en el seno de la solución respectivamente. Los valores de ϕ se obtienen resolviendo la ecuación:

$$0 = [M^-]\phi^3 - Q\phi^2 + [M^+]\phi + [D^{++}], \quad (2.12)$$

en que, $Q = [M^-] + [M^+] + [D^{++}] + \sigma^2/m$ y $m = 0,135 \cdot e^2 \text{nm}^{-4} \text{mol}^{-1}$. Esta ecuación tiene soluciones para cada valor de σ y para cada conjunto de concentraciones. Las raíces de la ecuación 2.12 se obtuvieron numéricamente con una planilla de cálculos (Lotus 123). En la figura 2.2 se muestra los valores de ϕ en función de $[D^{++}]$ a dos valores de σ ($\sigma = 0,11$ y $\sigma = 0,041 \text{ enm}^{-2}$, respectivamente). Los valores se obtuvieron suponiendo $[M^+] = 2,2 \text{ mM}$, $[M^-] = 2,2 + 2[D^{++}]$. La línea continua sobre los puntos correspondientes a las soluciones para $\sigma = 0,041 \text{ enm}^{-2}$ fué trazada con la expresión:

$$\phi = 16,69 \text{Log}_{10} [D^{++}] + 19,50, \quad (2.13)$$

evaluada para el intervalo 0,1-10 mM. Las concentraciones superficiales de los iones bloqueadores fueron evaluadas con las ecuaciones 2.7 y 2.13.

2.5.2 Cinética.

El fin de este análisis es construir modelos cinéticos que den cuenta de la actividad de los canales. Para esto, el primer paso consiste en determinar la duración de cada una de las visitas a los estados abierto y cerrado del canal (durante un registro de corriente dado). Teóricamente, el paso desde el estado abierto al estado cerrado es instantáneo, por lo tanto, cuando se produce una transición abierto-cerrado en un registro de corriente, el curso temporal de la señal resulta de la composición del ruido eléctrico del sistema con la respuesta del filtro a un escalón de corriente (Colquhoun y Sigworth, 1983). Para medir las duraciones de cada visita al estado abierto y cerrado se usó un algoritmo creado en colaboración con el Dr. Andrés Oberhauser e instalado para el equipo existente en el laboratorio por los Drs. F. Bezanilla y O. Alvarez.

A partir de las mediciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado, se determina la fracción del tiempo en que el canal permanece abierto (P_o); dividiendo el tiempo total en el estado abierto por la duración del registro. En la práctica, para reducir la gran dispersión en la determinación de P_o debida a la presencia de eventos cerrados de muy larga duración

(tiempo promedio ≈ 1 s), en la determinación se ignoraron todos los eventos cerrados de duración mayor que 200 ms. El número de eventos ignorados representa menos del 1% de todos los eventos, pero en algunos casos ellos podían comprender hasta un 30% del tiempo de registro.

En este tipo de análisis, para distinguir en qué momento comienza una transición entre el estado abierto y cerrado y cuál es su duración se define un umbral que se encuentra a la mitad de la amplitud entre el nivel de corriente del canal abierto y el nivel de corriente del canal cerrado. Si la señal cruza el umbral se produce la detección de un evento. La duración del evento es el tiempo que toma la señal entre la detección del evento y la detección de otro evento en que la señal cruza el umbral en sentido contrario.

El método descrito fue usado, pues existe un gran caudal de correcciones para los artificios producidos por la respuesta de tiempo limitada del sistema de registro y el ruido eléctrico de la señal de corriente (Colquhoun y Sigworth, 1983, Blatz y Magleby, 1986a, McMannus y cols., 1987). Estos artificios son: no detección de eventos que son muy breves (eventos perdidos), subestimación de la duración de aquellos eventos detectados, pero, de muy corta duración y transiciones falsas producidas por el ruido de la señal (eventos falsos).

i.- Eventos perdidos. Para ellos no existe corrección posible a menos que esto se haga a la luz de un modelo cinético dado (Blatz y Magleby, 1986a).

ii.- Subestimación de las duraciones. La respuesta de un filtro Bessel de 8 polos ante una señal del tipo escalón se puede aproximar analíticamente. De esta manera, dada una duración detectada con el umbral usado, es posible calcular su duración teórica en un registro idealizado de corriente. Este método está descrito por Colquhoun y Sigworth (1983) y fue usado para calcular las duraciones idealizadas.

iii.- Eventos falsos. Esta fuente de artificios se evita filtrando la señal con frecuencias de corte cada vez más bajas, sin embargo, al bajar la frecuencia de corte es mayor el número de eventos reales no detectados. Entonces, para optimizar la información obtenida del registro es necesario buscar la mayor frecuencia de corte a la cual no se producen eventos falsos que se originan desde el nivel abierto o cerrado. Esto se llevó a cabo empíricamente para cada registro

experimental de la siguiente manera: con la señal filtrada a una frecuencia de corte dada, se cargó la memoria del computador con el trozo de registro a analizar, se midió la mitad de la amplitud entre la corriente del estado abierto y la corriente del estado cerrado. Luego, se puso un umbral a una distancia equivalente, pero en dirección opuesta sobre el promedio del nivel abierto ó bajo el promedio del nivel cerrado. Si la señal de corriente cruzaba el umbral en una o más ocasiones, se cargaba la memoria con el mismo registro pero filtrado a una frecuencia de corte más baja y se fijaba nuevamente el umbral. Esto se repetía hasta que a una frecuencia de corte dada no se detectara ningún cruce del umbral. En aquellos experimentos en que se estudió la cinética a varios potenciales, para uniformizar la frecuencia de corte, la determinación se hizo con el registro de menor amplitud. Para todos los análisis cinéticos que se muestran en esta tesis, la frecuencia de corte (-3 dB) usada fue de 300 Hz, excepto en los resultados que semuestran en la figura 3.34 y 3.35 en que fue de 250 Hz.

2.5.2.1 Distribución de tiempos de permanencia.

Las duraciones de los tiempos de permanencia en los estados cerrado o abierto se distribuyeron en intervalos de tiempo cuyo tamaño crece exponencialmente con la escala de tiempo (Sigworth y Sine, 1987). Se fijaron 10 intervalos por década, cuyos límites inferior y superior, t_l y t_{l+1} respectivamente están dados según:

$$t_l = 10^{l/10} \quad \text{y} \quad t_{l+1} = 10^{(l+1)/10} \quad (2.14)$$

en que el índice l es un número entero que va entre -50 y 30. De esta manera en 80 intervalos se puede agrupar eventos con duraciones que difieren hasta en 8 órdenes de magnitud (desde $10 \mu\text{s}$ hasta 1000 s). Usar este tipo de distribuciones representa una gran ventaja con respecto a distribuciones construidas con intervalos de tiempo espaciados igualmente, puesto que al agrupar las duraciones en un número pequeño de intervalos, el ajuste de las distribuciones puede hacerse hasta varios órdenes de magnitud más rápido (Sigworth y Sine, 1987, McManus y cols., 1987).

2.5.2.2. Ajuste de distribuciones de tiempos de permanencia.

Las distribuciones de tiempos abiertos y cerrados fueron ajustadas con un algoritmo escrito por el Dr. O. Alvarez basado en Colquhoun y Sigworth (1983) y Sigworth y Sine (1987) que maximiza la probabilidad de que la distribución sea descrita por un conjunto dado de parámetros.

En una distribución de tiempos de permanencia, la verosimilitud es igual a la probabilidad de obtener una distribución determinada dado un conjunto de parámetros. El logaritmo de la verosimilitud ($L(\theta)$) de la distribución dado un conjunto θ de parámetros y una función de distribución de probabilidad $F(t_i|\theta)$ se evalúa con la siguiente expresión:

$$L(\theta) = \sum_i n_i \ln \{ [F(t_{i+1}|\theta) - F(t_i|\theta)] / [F(t_{imax}|\theta) - F(t_{imin}|\theta)] \} \quad (2.15)$$

en que n_i es el número de observaciones que quedaron dentro del intervalo I de la distribución, $F(t_i|\theta)$ se evalúa en el borde inferior del intervalo I , $F(t_{imax}|\theta)$ y $F(t_{imin}|\theta)$ corresponden a la función de distribución evaluada en los intervalos primero y último de la distribución experimental, estos intervalos son I_{min} e I_{max} respectivamente (Sigworth y Sine, 1987).

Las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado siguen una distribución de tipo exponencial. El caso general es que la función de distribución de probabilidad sea multiexponencial, por esta razón la función que se evalúa sobre la distribución experimental es:

$$F(t|\theta) = 1 - \sum_j a_j \exp(-t/\tau_{a_j}), \quad (2.16)$$

en que θ es el conjunto de pares de coeficientes a_j y constantes de tiempo τ_{a_j} . a_j representa la fracción de eventos de la distribución que pertenecen a la población con constante de tiempo τ_{a_j} .

La maximización de $L(\theta)$ se hace mediante un algoritmo iterativo escrito por el Dr. Alvarez que usa el método de Gauss-Newton para buscar el máximo de $L(\theta)$ en función de cada uno de los parámetros de ajuste (Alvarez y cols., 1991).

Al finalizar la rutina de maximización, el programa entrega una estimación que es el logaritmo natural de la verosimilitud y con esto nos da un criterio estadístico para discriminar entre varios conjuntos de parámetros. El doble de la diferencia del logaritmo de la verosimilitud se distribuye como Chi cuadrado (Rao, 1973; Horn y Lange, 1983; Blatz y Magleby, 1986b) con grados de libertad igual a la diferencia entre el número de parámetros independientes en dos

ajuste comparados.

Cuando las distribuciones de los tiempos de permanencia en los estados cerrado y abierto son monoexponenciales, significa que hay una sola población de eventos abiertos y una sola población de eventos cerrados, y la constante cinética que abandona el estado, por ejemplo abierto, corresponde al recíproco de la constante de tiempo de la distribución de los tiempos de permanencia en el estado abierto (Colquhoun y Hawkes, 1981; Alvarez, 1986).

2.5.2.3 Estudios de correlación entre duraciones de eventos abiertos y cerrados adyacentes.

Cuando las distribuciones de las duraciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado contienen más de un componente exponencial, varios modelos cinéticos distintos pueden dar cuenta de ellas. Entonces, la determinación de un modelo cinético sólo a partir de las distribuciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado se hace ambigua, a menos que se considere la historia del registro de corriente a través del canal. Así, modelos cinéticos diferentes pueden generar historias diferentes, pero distribuciones idénticas de tiempos de permanencia. Una manera de estudiar la historia del registro es establecer la existencia de correlación entre, por ejemplo, eventos de cierre de una determinada duración y los eventos de apertura adyacentes a él (Labarca y cols., 1985; 1985; Fredkin y cols., 1985; McManus y cols., 1985; Blatz y Magleby, 1989).

El análisis empleado en este trabajo promedia la duración de todos los eventos abiertos que acompañan a un evento cerrado de una duración dada (Blatz y Magleby, 1989). Este tipo de análisis se efectuó fijando intervalos condicionantes que corresponden a dos de los intervalos de los usados en las distribuciones de tiempos de permanencia, i.e. los límites inferior y superior de los bordes de cada intervalo condicionante b_i y b_{i+1} respectivamente están dados por la expresión:

$$b_i = 10^{i/5} \quad \text{y} \quad b_{i+1} = 10^{(i+1)/5} \quad (2.17)$$

en que i va entre -25 y 15. Si un cierre tiene una duración que esta dentro del intervalo condicionante, entonces, se toma la duración de los dos eventos abiertos que flanquean este cerrado. Para hacer este tipo de análisis se desarrolló un programa en FORTRAN que recorre un

registro de corriente, determina cuantas duraciones de eventos cerrados quedaron dentro del intervalo condicionante, y promedia todos los abiertos que flanquean a los cerrados que quedaron en el intervalo.

2.5.2.4 Selección de modelos y determinación de las constantes cinéticas.

En un esquema cinético, el número de estados del esquema es a lo menos igual al número de componentes en las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado (Colquhoun y Hawkes, 1981). Por ejemplo, si el número de componentes en la distribución de abiertos de un registro de canales es dos, entonces, el modelo cinético que de cuenta de ese registro debe poseer a lo menos dos estados abiertos. Con este criterio se propusieron distintos modelos cuyos conjuntos de constantes cinéticas dieran cuenta de las distribuciones de los tiempos de permanencia. Los registros simulados obtenidos a partir de cada modelo se sometieron al análisis de correlación descrito en la sección 2.5.2.3. La selección de los modelos se hizo comparando la similitud entre los resultados de correlación que entrega cada modelo y los resultados de correlación del registro experimental.

El ajuste de las constantes cinéticas para cada uno de los modelos probados se obtuvo buscando el máximo de la verosimilitud de que un conjunto de constantes de velocidad de cuenta de las distribuciones encontradas, para un modelo dado (Horn y Lange, 1983; Colquhoun y Sigworth, 1983; Horn y Vandenberg; 1984). El programa que hace este tipo de ajuste, fué escrito en FORTRAN y opera de la siguiente manera: Dado un modelo cinético y un conjunto de constantes cinéticas, se simula un registro que contiene 10^5 eventos abiertos y cerrados (ver secc. 2.5.2.5). A partir de este registro simulado se construyen distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrados (ver secc. 2.5.2.1). Las distribuciones se construyen considerando el tiempo muerto del sistema de registro (ver secc. 2.5.2.6). El área de estas distribuciones se normalizan a 1 para que la distribución represente la densidad de probabilidad. Así, para toda la distribución se evalúa la verosimilitud (L_I) en cada intervalo I mediante la expresión:

$$L_i = n_i \ln (dp_i), \quad (2.18)$$

en que dp_i es la densidad de probabilidad del intervalo I obtenida de la distribución de eventos simulados y n_i es el número de eventos cuyas duraciones quedaron dentro del intervalo I . Puesto que en la distribución cada observación es independiente, la verosimilitud de la distribución es el producto de todas las verosimilitudes de cada intervalo, entonces, el logaritmo de la verosimilitud (L) corresponde a:

$$L = \sum_i L_i. \quad (2.19)$$

La función L depende del conjunto de parámetros cinéticos que dan cuenta de las distribuciones (es decir, las constantes cinéticas). La maximización de L en función de las constantes cinéticas se de la manera descrita en la sección 2.5.2.2.

Este programa se ejecutó en un computador tipo IBM-AT con una tarjeta Definicon (Definicon Systems Inc). Esta tarjeta contiene un procesador de 32 bits @ 25 Mhz y permite manejar hasta 3.8 MBytes de memoria en arreglos. Para converger a una solución donde se encuentra un máximo en la verosimilitud, el programa demora entre 10 y 50 horas.

Las curvas-distribución con que se ajustan las distribuciones experimentales son generadas por simulación a partir de números aleatorios (sección 2.5.2.5), por tanto, ellas tienen un componente importante de azar, por esta razón, frecuentemente el programa se detiene en máximos locales dando como resultado ajustes de poca utilidad. Este inconveniente se atacó de dos maneras: aumentando al máximo el número de eventos simulados y ajustando primero las curvas teóricas del ajuste de distribuciones exponenciales obtenidas de la manera descrita en la sección 2.5.2.2 por la expresión 2.16, pues ellas presentan un contorno 'suave'. Después de establecida una convergencia aceptable con las curvas teóricas, se evalúan los parámetros obtenidos en la distribución experimental y se hace converger a una nueva solución. Las constantes cinéticas obtenidas a partir de la última solución son las que se usaron como dato experimental.

2.5.2.5 Generación de registros de corriente simulados a partir de los modelos propuestos

Un registro simulado es una secuencia de duraciones de eventos cerrados y abiertos alternados que ha sido generada con un modelo determinado.

Los registros idealizados se contruyeron con un programa escrito en FORTRAN que sigue la metodología descrita por DeFelice y Clay (1983). Este programa calcula el tiempo de permanencia en un estado I cada vez que este estado es visitado considerando la siguiente expresión:

$$t_i = -m_i \ln(\text{RND}), \quad (2.20)$$

en que t_i es la duración del tiempo de permanencia en estado I una vez que este ha sido visitado, RND es un número aleatorio entre 0 y 1. m_i representa el tiempo promedio de permanencia en el estado I y corresponde al recíproco de la sumatoria de todas las constantes de velocidad de abandonar el estado I :

$$m_i = [\sum_j k_{ij}]^{-1}. \quad (2.21)$$

Así, la probabilidad de que a partir de I , el canal salte al estado J (P_{ij}) es k_{ij} dividida por la sumatoria de todas las constantes que abandonan el estado I . Por lo tanto se puede escribir:

$$P_{ij} = k_{ij} m_i. \quad (2.22)$$

El programa funciona de esta manera: cuando se encuentra en el estado I se evalúa el tiempo de permanencia t_i con la expresión 2.20, luego se determina a cuál de los estados contiguos se salta comparando RND con los intervalos $[0, P_{ij}]$, $[P_{ij}, P_{ij} + P_{ij+1}]$,... De esta manera, si $\text{RND} < P_{ij}$, la transición es al estado J , si $\text{RND} < P_{ij} + P_{ij+1}$, la transición es al estado $J+1$...

En todos los modelos, la conductancia de los estados cerrados es 0, entonces en un registro de corriente de canal único es imposible distinguir una transición entre dos estados cerrados vecinos. Así, un evento cerrado terminará sólo cuando desde alguno de los estados cerrados se salte a alguno de los estados abiertos. Este mismo principio rige para los estados abiertos, es decir, todos ellos poseen la misma conductancia.

Cuando se produce una transición desde alguno de los estados abiertos del modelo cinético a alguno de los cerrados, se ha concluido un evento abierto, en este momento se

comienza a sumar todas la duraciones de cada visita entre estados cerrados del modelo. La suma concluye cuando desde uno de los estados cerrados se transita a uno de los abiertos del esquema y con esto se determina la duración de un evento cerrado. Es decir, un evento cerrado simulado consiste en la suma de todos los tiempos de permanencia en los distintos estados cerrados que ocurrieron antes de que se produjera transición hacia alguno de los estados abiertos. Procediendo de esta misma manera se contabilizan las duraciones de cada evento abierto simulado.

2.5.2.6 Construcción de histogramas de eventos simulados.

Para construir los histogramas de tiempos de permanencia en los estados cerrado y abierto de los registros simulados, todas aquellas transiciones menores al tiempo muerto del filtro fueron tomadas como eventos no detectados (ver secc. 2.5.2). Esto significa que las duraciones, de por ejemplo los cerrados muy breves, se sumaron a los tiempos abiertos que lo flanquearon y de estos dos eventos abiertos se hizo uno solo cuya duración es la suma de ambos más la del evento cerrado no detectado. El algoritmo que ejecuta este proceso fué escrito por el Dr. O. Alvarez.

Para construir las distribuciones de eventos simulados, al igual que en las distribuciones experimentales, las duraciones se agruparon en intervalos descritos por la expresión 2.14.

2.5.2.7 Selección de modelos.

Una vez obtenido el mejor ajuste de cada modelo con la metodología descrita en la sección 2.5.2.4, con las constantes cinéticas de cada uno de ellos se generaron registros simulados y se sometieron al estudio de correlación descrito en la sección 2.5.2.2. La correlación entre abiertos y cerrados de cada uno de ellos fué comparada con la correlación de los registros experimentales, el modelo elegido fué aquel que mostró una correlación más parecida a la de los registros experimentales.

3.- RESULTADOS

Cuando se comenzó este trabajo de tesis, las preparaciones de membrana de túbulos transversales de músculo esquelético de *Caudiververa caudiververa* se hicieron en ausencia de inhibidores de proteasas y una parte importante de los resultados que se muestran en esta tesis corresponden a experimentos hechos con esta preparación. Sin embargo, en una etapa avanzada del trabajo las preparaciones de membrana se hicieron en presencia de inhibidores de proteasas (métodos, sección 2.1). Las propiedades de conducción de los canales de sodio modificados por BTX de estas diferentes preparaciones de membrana son diferentes. Por esta razón, los resultados del capítulo de conducción iónica con los canales de ambas preparaciones se presentan en forma paralela (sección 3.2). A partir de la sección 3.3 se muestran los resultados del estudio de las propiedades cinéticas del canal.

3.1 Los canales de sodio obtenidos de las preparaciones hechas en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas muestran conductancias diferentes, pero características cinéticas similares.

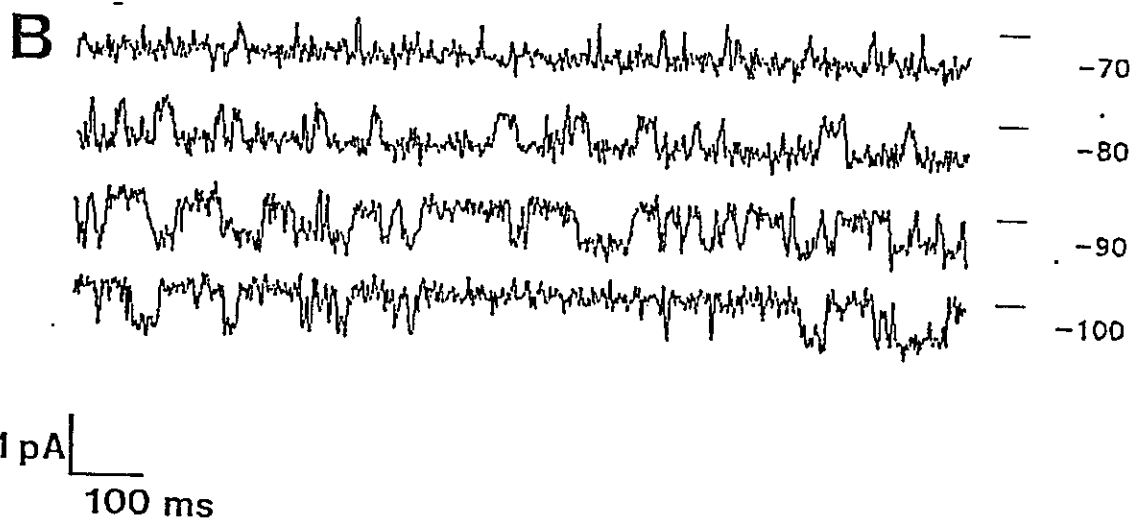
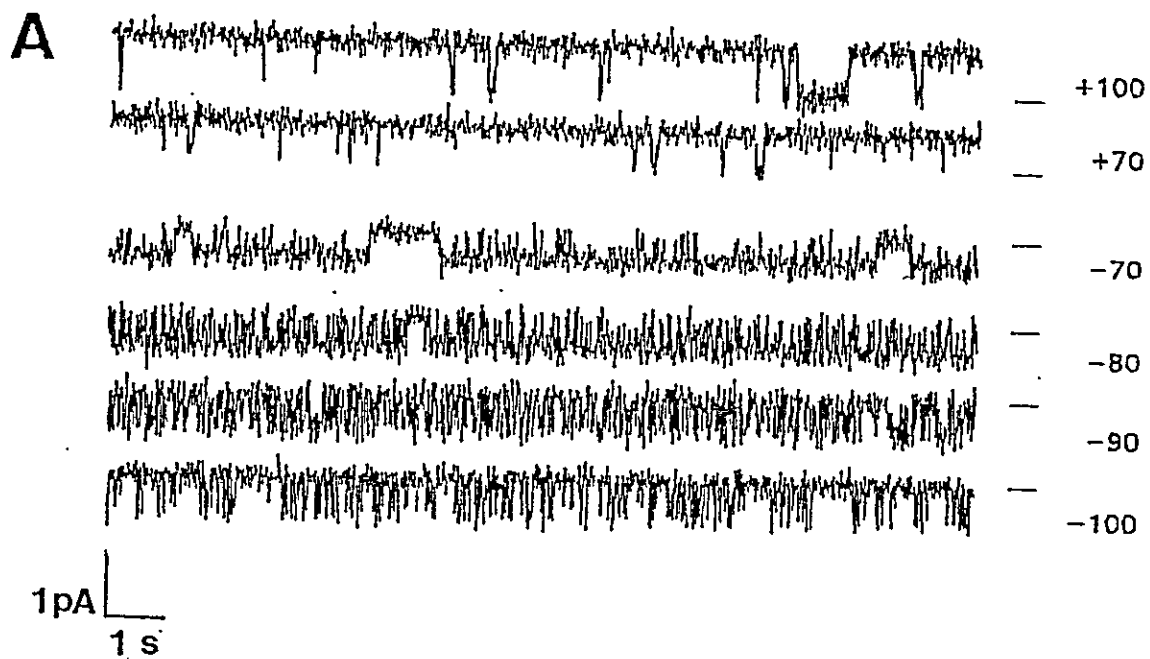
3.1.1 Canales obtenidos de preparaciones hechas en ausencia de inhibidores de proteasas.

En la figura 3.1A se observan registros de un canal sometido a potenciales entre +100 y -100 mV en NaCl 400 mM en el lado interno y NaCl 200 mM en el lado externo del canal. En estos registros, el nivel de corriente que corresponde al estado cerrado del canal y el potencial aplicado

Figura 3.1. Registros de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas.

A.- Registro de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas. El canal fue incorporado a la bicapa en presencia de 400 y 200 mM NaCl en los lados interno y externo, respectivamente. El nivel de corriente correspondiente al estado cerrado y está indicado por una barra horizontal al extremo derecho de cada registro, los números junto a la barra horizontal indican el valor del potencial eléctrico aplicado en mV. Registro filtrado a 100 Hz (-3 dB). [BTX] = 100 nM.

B.- Registro del mismo canal a los potenciales indicados a la derecha de cada registro. La escala de tiempo está expandida con respecto al panel A. Notese que los eventos que aparecen como espigas en los registros del panel A, en este panel se observan resueltos completamente.



(en mV) están indicados al costado derecho por una línea horizontal y un número, respectivamente. La figura 3.1B muestra una expansión en el tiempo de aquellos registros de la figura 3.1A en que suceden muchas y muy breves transiciones entre los estados abierto y cerrado, en estos registros se puede apreciar que las transiciones breves son resueltas completamente.

En los registros de la figura 3.1 se observa que a los potenciales positivos la apertura del canal genera una corriente positiva (que se visualiza como deflexión hacia arriba del trazo de corriente), a potenciales negativos la apertura del canal genera corriente negativa (deflexión hacia abajo en el trazo de la corriente), y en ambos casos la amplitud de la corriente es mayor cuando el valor absoluto del voltaje aumenta, por ejemplo, la amplitud de la corriente a +100 mV es mayor que a +70 mV. Debido a las condiciones iónicas en que se registró este canal, también se observa en estos registros que la amplitud de la corriente a potenciales negativos es menor que a potenciales positivos equivalentes, por ejemplo, la amplitud de los saltos es mayor a +70 que a -70 mV. Este conjunto de observaciones se resumen en la figura 3.3, en ella se grafica la amplitud de la corriente del canal de la figura 3.1A (en pA) como función del potencial eléctrico aplicado (cuadrados negros). La conductancia de este canal, obtenida de la pendiente de una regresión lineal de los valores en el gráfico, es de 9,5 pS.

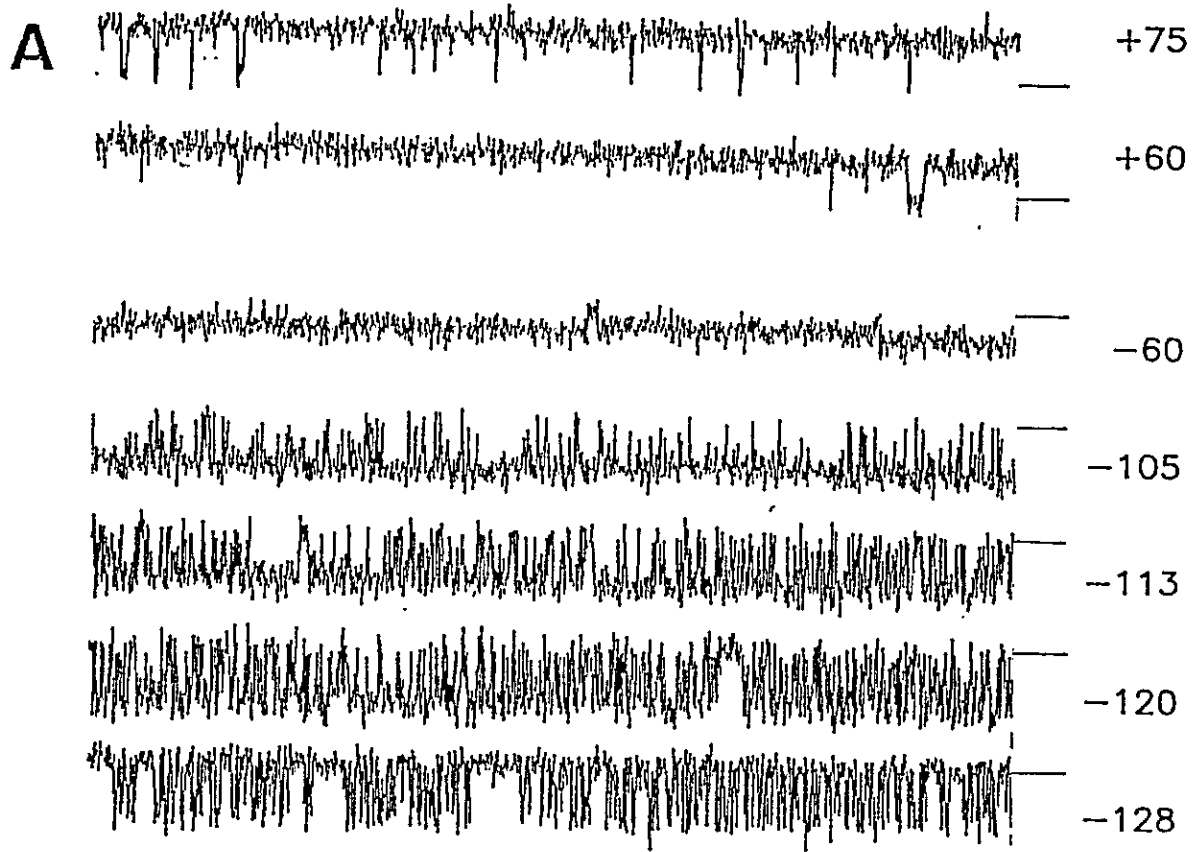
Mediante el uso de la ecuación de Nernst y a partir de las actividades de Na^+ y Cl^- (Métodos sección 2.5.1.3.3; Villarroel y cols., 1991) internas y externas, respectivamente, es posible calcular el valor del voltaje para el cual la corriente a través del canal se anularía si el canal fuera perfectamente catiónico, este valor es de -16,3 mV (apuntado en la figura por una flecha negra invertida). Para un canal perfectamente aniónico, este valor es +16,3 mV. La figura 3.3 ilustra que el potencial de inversión (V_p), interpolado a partir de la regresión lineal es de -15,2 mV. Aplicando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Kast (Hodgkin y Kast, 1949), y a partir de las actividades iónicas en ambos lados de la bicapa y el valor obtenido de V_p , es posible calcular la permeabilidad relativa al Na^+ con respecto al Cl^- ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$), el valor de obtenido para $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ es 29,91.

A partir de siete experimentos diferentes en que la concentración de NaCl en ambos lados de la bicapa era 200 mM, se determinó que la conductancia promedio de los canales de sodio

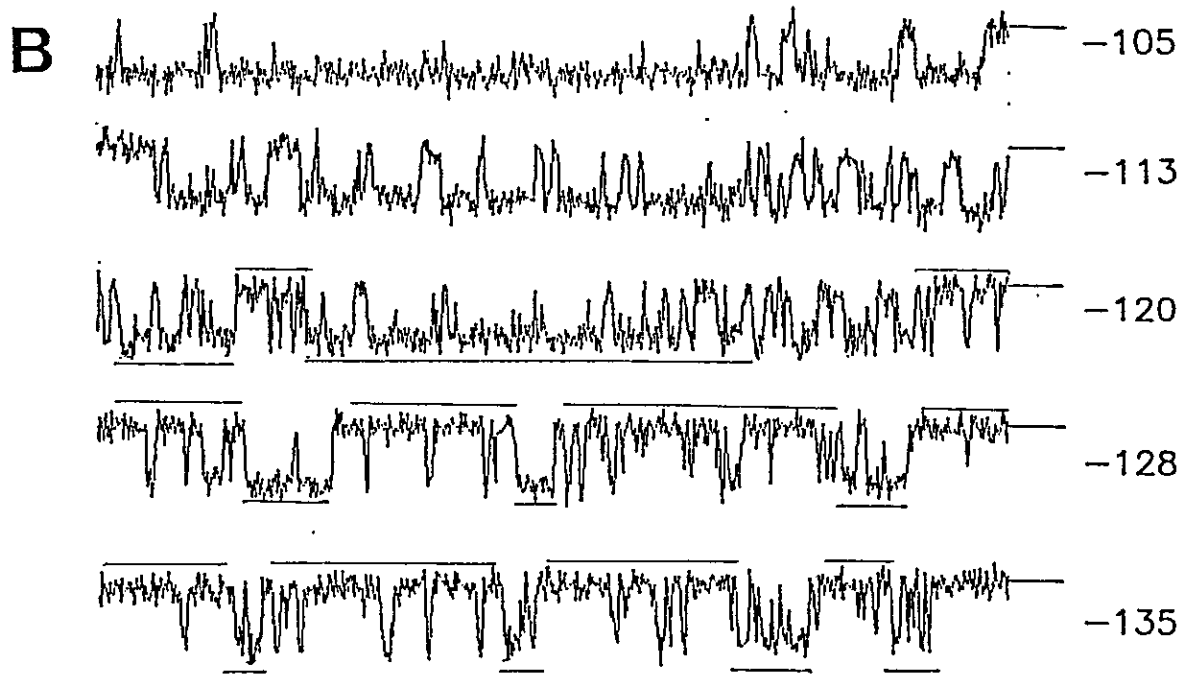
Figura 3.2. Registros de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en presencia de Inhibidores de proteasas.

A.- Registro de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas. El canal fue incorporado a la bicapa en presencia de 400 y 200 mM NaCl en los lados interno y externo, respectivamente. El nivel de corriente correspondiente al estado cerrado y está indicado por una barra horizontal al extremo derecho de cada registro, los números junto a la barra horizontal indican el valor del potencial eléctrico aplicado en mV. Registro filtrado a 300 Hz (-3 dB). [BTX] = 100 nM.

B.- Registro del mismo canal a los potenciales indicados a la derecha de cada registro. La escala de tiempo está expandida con respecto a los registros del panel A. Las líneas sobre y bajo los registros fueron trazadas a ojo, ellas representan las regiones del registro compuestas de eventos cerrados de larga duración acompañados por aperturas breves (línea sobre el registro) y las regiones compuestas de eventos abiertos de larga duración acompañados por eventos cerrados breves (línea bajo el registro). Nótese que los eventos que aparecen como espigas en los registros de la figura 3.2A se observan resueltos completamente.



1 pA
1/0.1 s



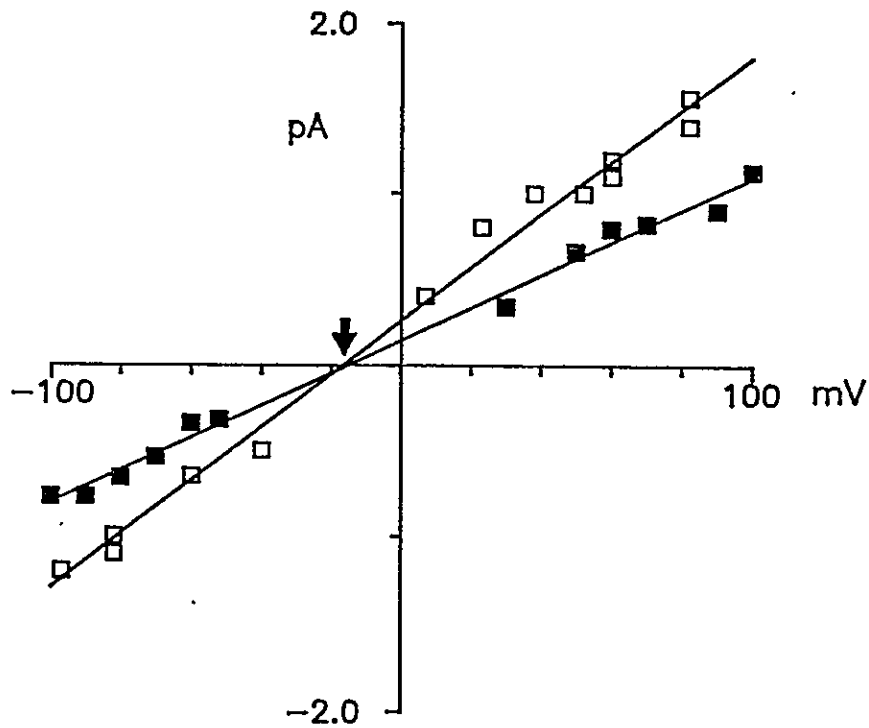


Figura 3.3. Relaciones corriente-voltaje de los canales provenientes de ambas preparaciones.

Relaciones corriente-voltaje para los mismos canales mostrados en las figuras 3.1 y 3.2. Los cuadrados blancos y negros indican los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia y en presencia de inhibidores de proteasas, respectivamente. A cada potencial, la amplitud de la corriente se midió como la diferencia entre los promedios de corriente del canal abierto y cerrado (sección 2.5.1.1). La línea continua representa una regresión lineal ajustada a los valores experimentales. Las conductancias calculadas a partir de las pendientes de estas curvas son: 9,5 y 15,6 pS, para los canales provenientes de las preparaciones hechas en ausencia y en presencia de inhibidores de proteasas, respectivamente. Los potenciales de Inversión Interpolados a partir de las regresiones lineales son -15,2 y -16,6 mV respectivamente. La flecha apunta a -16,3 mV, que es el valor del potencial de equilibrio para el ion sodio y fue calculado con la expresión:

$$V_r = 58 \log (a_{in} / a_{ex}),$$

en que V_r corresponde al potencial de Inversión medido en mV, a_{in} y a_{ex} corresponden a las actividades iónicas interna y externa de sodio, respectivamente.

modificados por BTX es de $11,4 \pm 1,2$ pS.

3.1.2 Canales obtenidos de preparaciones hechas en presencia de inhibidores de proteasas.

En la figura 3.2A se observan registros de corriente de un canal en las mismas condiciones iónicas de la figura 3.1. Estos registros fueron obtenidos a los distintos potenciales que se encuentran anotados al costado derecho de cada registro, junto a ellos están las barras que indican los niveles de corriente del canal cerrado. De la misma manera que en la figura 3.1B, la figura 3.2B corresponde a una expansión en el tiempo de aquellos registros de la figura 3.2A en los que las transiciones entre los estados abierto y cerrado del canal son muchas y muy breves. En estos registros estas transiciones de corta duración se observan completamente resueltas. La amplitud de los saltos de corriente entre el estado abierto y el cerrado es mayor que en los registros de la figura 3.1. En la figura 3.3 se grafica la amplitud de la corriente de los registros de canal único que se ilustran en la figura 3.2 como función del potencial eléctrico (cuadrados blancos). La conductancia de este canal, obtenida de la pendiente de una regresión lineal de los valores en el gráfico, es de 15,6 pS y el potencial de inversión, interpolado a partir de la regresión lineal, es de -16,6 mV, nuevamente, este valor indica que este canal conduce fundamentalmente iones sodio y no cloruro (No es posible calcular la razón P_{Na}/P_{Cl} , pues, el valor de V_f es más negativo que -16,3 mV).

La conductancia promedio de cinco canales de esta preparación cuando la concentración de NaCl en ambos lados del canal es de 200 mM fué de $16,6 \pm 1,5$ pS, este valor de conductancia es 1,46 veces mayor que el promedio de la conductancia medida, en las mismas condiciones experimentales, para los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas.

3.1.3 La cinética de los canales de ambas preparaciones es dependiente del voltaje.

Cuando la fibra muscular esquelética es tratada con BTX se despolariza gradualmente hasta llegar a un valor cercano a 0 mV (Alburquerque, 1972). De esta observación se concluyó que

los canales de sodio modificados por BTX se encuentran abiertos al potencial de reposo de la célula. Por otra parte, los experimentos de potencial controlado muestran que la curva de activación de los canales de sodio en presencia de BTX se desplaza entre 20 a 60 mV hacia la izquierda del eje del potencial (Khodorov, 1985, Huang y cols., 1982, Huang y cols, 1889). Así, el efecto de la BTX no es solo evitar que los canales de sodio se inactiven, sino que también, ella promueve una estabilización del estado abierto del canal a potenciales a los cuales los canales no modificados por BTX se encuentran cerrados. Los canales de sodio que han sido incorporados a bicapas de lípidos muestran la curva de activación con un desplazamiento en el eje del potencial similar al que muestran los registros de corrientes macroscópicas. En ellos, el potencial al cual el canal permanece la mitad del tiempo total en el estado abierto ($P_o = 0,5$) oscila entre -110 y -70 mV (Krueger y cols., 1983; Moczydlowski y cols., 1984a; Recio-Pinto y cols., 1987; Behrens y cols., 1989). Los canales de sodio modificados por BTX presentes en las preparaciones de membrana de músculo esquelético de *Caudiververa caudiververa* muestran un comportamiento similar.

De los registros mostrados en las figuras 3.1 (A y B) y 3.2 (A y B) se observa que la fracción del tiempo en que el canal se encuentra en el estado abierto cambia con el potencial eléctrico aplicado, a medida que el potencial se hace más negativo, la fracción del tiempo en que el canal se encuentra en el estado abierto disminuye. Esta dependencia del potencial se observa con mayor detalle en los registros expandidos en el tiempo de las figura 3.1B y 3.2B, que corresponden a los voltajes a los cuales se producen más transiciones entre los estados abierto y cerrado con duraciones del orden de los milisegundos. Por otra parte, a potenciales de signo positivo, independientemente del valor del voltaje aplicado, el canal se encuentra casi la totalidad del tiempo en el estado abierto.

Es intresante notar que los registros de corriente mostrados en las figuras 3.1 y 3.2 son muy similares, sin embargo, ellos difieren en la amplitud de los saltos de corriente y en los potenciales a los cuales ellos se encuentran con determinado valor de P_o . Por ejemplo, en el registro a -100 mV de la figura 3.1, el canal está la mayor parte del tiempo en el estado cerrado ($P_o \approx 0,2$), mientras que el canal de la figura 3.2 a -105 mV se encuentra la mayor parte del tiempo en

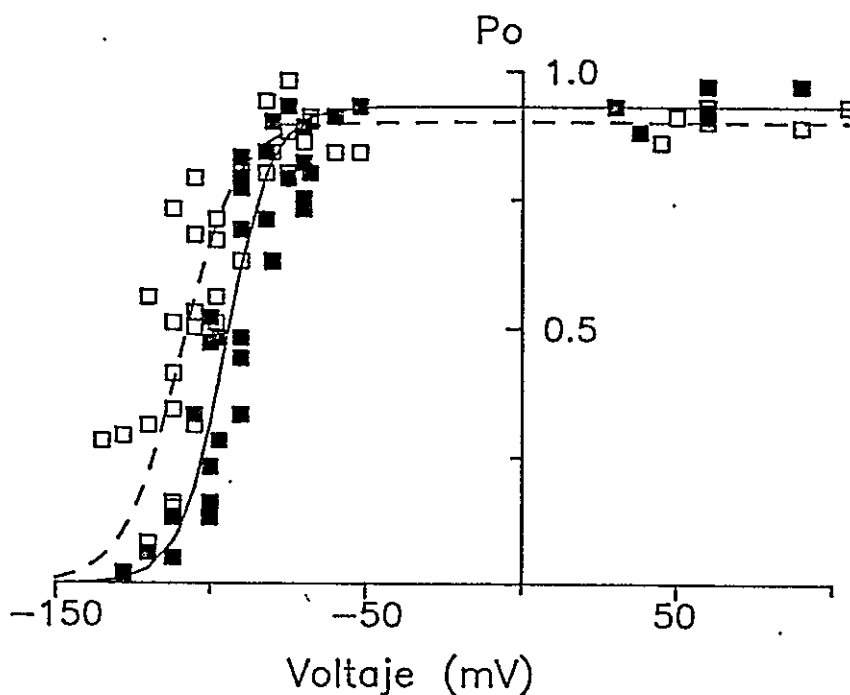


Figura 3.4. P_o en función del voltaje.

Los valores de P_o graficados son tomados de experimentos hechos a una concentración de NaCl-200 mM en ambos lados de la bicapa y en BTX 100 nM. Los experimentos con los canales provenientes de las preparaciones hechas en ausencia y en presencia de inhibidores de proteasas están representados por cuadrados negros y blancos, respectivamente. Las líneas continua y discontinua fueron trazadas a partir de la ecuación 3.1, con los valores promedio de V_o , n y P_{max} de cada población de canales. Para calcular P_o se midieron las duraciones de todos los eventos abiertos y cerrados de un registro de corriente. P_o se calculó de la siguiente manera (sección 2.5.2):

$$P_o = \frac{\sum ta_i}{[\sum ta_i + \sum (tc_i < 200 \text{ ms})]},$$

en que ta_i y tc_i corresponden a las duraciones de cada evento abierto y cerrado del registro de corrientes.

Los eventos cerrados mayores que 200 ms se ignoraron para reducir la dispersión en los valores de P_o producidas por eventos cerrados muy prolongados (duración promedio ≈ 1 s). A potenciales mayores que -60 mV, el efecto de este procedimiento fue estabilizar los valores de P_o en torno a 0,9.

el estado abierto ($P_o \approx 0,85$). Por otra parte, en el registro a -128 mV de la figura 3.2 la fracción del tiempo en que el canal estuvo abierto fué similar a la del canal de la figura 3.1 registrado a -100 mV. Estos resultados indican que la dependencia del voltaje de un canal con respecto al otro está desplazada en ≈ 30 mV. Estos desplazamientos de las curvas de activación también se observaron entre canales de la misma preparación y la posición del intervalo de voltajes en el que se produce la mayor dependencia del potencial, en dos canales distintos, puede estar desplazada hasta en 40 mV. Este tipo de observaciones se resumen a continuación.

En la figura 3.4 se grafica la fracción del tiempo en que el canal estuvo en el estado abierto, P_o , en función del potencial aplicado para una serie de experimentos en Na^+ 200 mM presente en ambos lados de la membrana. Los canales provenientes de las preparaciones hechas en ausencia y en presencia de inhibidores de proteasas están representados por cuadrados negros y blancos, respectivamente. Las líneas de trazo continuo y discontinuo representan el ajuste de un modelo de distribución de cargas en un campo eléctrico para los canales obtenidos en ausencia y presencia de inhibidores de proteasas, respectivamente.

$$P_o = P_{\max} \{ 1 + \exp [-nF(V-V_o) / RT] \}^{-1}, \quad (3.1)$$

en que V es el potencial aplicado, F es la constante de Faraday, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, n corresponde al número efectivo de cargas que se mueven en el campo eléctrico para abrir el canal, P_{\max} es el valor máximo que alcanza la fracción del tiempo que el canal permanece en el estado abierto, y V_o es el potencial al cual $P_o = 1/2 P_{\max}$.

Sobre la base de los resultados obtenidos en seis canales de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas, se obtuvieron valores promedio para V_o , n y P_{\max} (con sus respectivas desviaciones típicas) iguales a: $-99,4 \pm 7,5$ mV, $3,1 \pm 0,6$ y $0,92 \pm 0,03$, respectivamente. Por otra parte, en cinco canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas los valores de V_o , n y P_{\max} son: $-110,4 \pm 9,0$ mV, $2,7 \pm 0,4$ y $0,90 \pm 0,03$. Suponiendo que los parámetros de ajuste V_o y n de la expresión 3.1 se distribuyen normalmente en cada muestra, se aplicó la prueba de *Student* para muestras pequeñas, tanto para V_o como para n , las diferencias entre las dos poblaciones de canales no son significativas ($t <$

2,26; $p > 0,95$, 9 grados de libertad).

3.2 Sistema de conducción del canal de sodio modificado por BTX.

3.2.1 Los canales de sodio de músculo esquelético de rana muestran subestados de conductancia.

En los registros de las figuras 3.1 y 3.2 se aprecia cada vez que el canal se abre (a un determinado voltaje) lo hace siempre con la misma amplitud, en este caso se dice que el canal presentó un solo estado abierto de conductancia. Cuando la conductancia (a un mismo potencial aplicado) puede presentar valores diferentes, se dice que el canal presenta subestados de conductancia. Varios autores han descrito la presencia de subestados de conductancia en los canales de sodio, tanto en aquellos no tratados farmacológicamente, como en aquellos modificados por BTX (Patlak, 1988; Green y cols., 1987a; ver Meves y Nagy, 1989).

En los resultado que se describen en la próxima sección, se muestra que los canales de sodio de la rana presentan subestados de conductancia. Los criterios usados en este trabajo para distinguir si en la bicapa está presente un solo canal con subestados de conductancia o dos canales de conductancia diferente son dos (Fox, 1987):

i.- Cuando hay dos canales diferentes, es esperable observar cuatro niveles de corriente. La figura 3.5A muestra un registro idealizado de corriente que tiene dos canales de distinta conductancia, en este registro se observan los cuatro niveles de corriente: cuando ambos canales están cerrados (señalado con una línea horizontal), no hay corriente. Cuando uno de los dos está abierto, la corriente registrada corresponde a uno u otro nivel (señalados como a y b). Y cuando ambos canales están abiertos, la corriente medida es la suma de las contribuciones de cada canal por separado (señalado como a + b). En cambio, cuando hay un solo canal con dos conductancias diferentes es esperable encontrar sólo tres niveles de corriente (figura 3.5B); Cuando el canal está cerrado, (no hay corriente; señalado con una línea horizontal), cuando el canal se abre al estado de mayor conductancia (la corriente tiene un valor máximo; señalado como a') y cuando el canal está abierto al estado de menor conductancia (la corriente tiene un valor

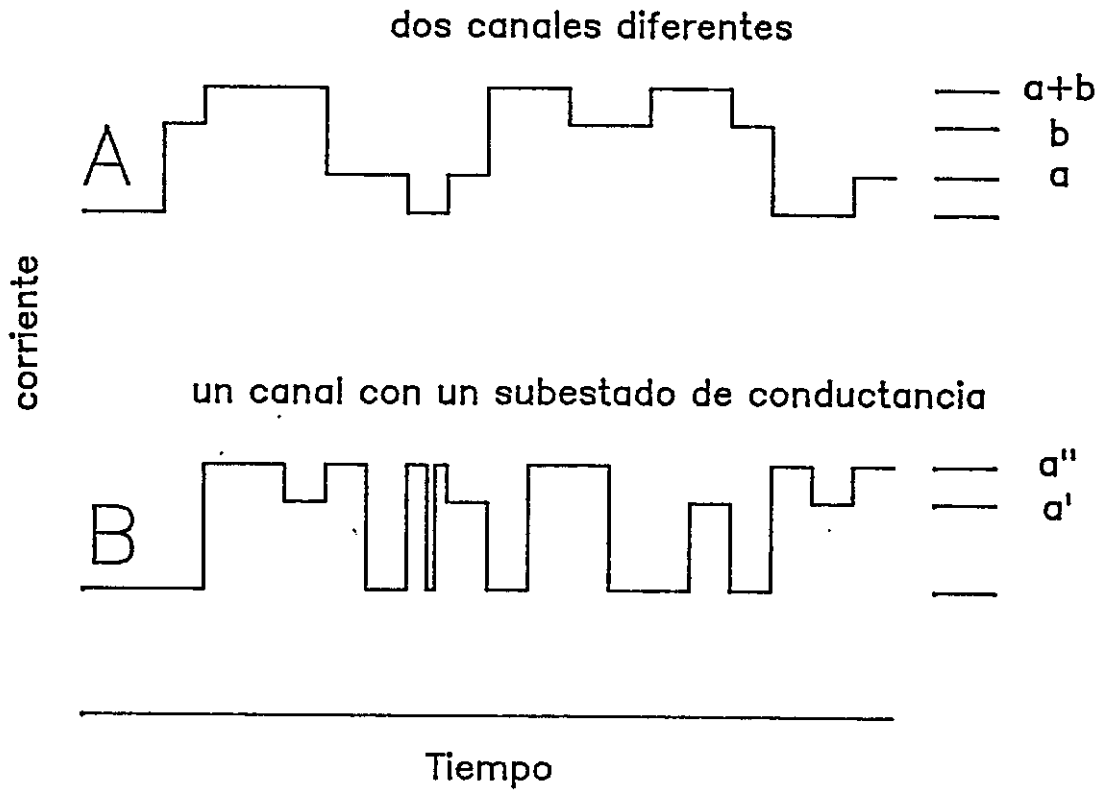


Figura 3.5. Comparación entre un registro con dos canales diferentes y un registro de un canal con dos conductancias diferentes.

A.- Registro Idealizado de dos canales de conductancias diferente. A la derecha del registro se señalan los niveles de corriente correspondiente los dos canales cerrados (línea horizontal), uno de los dos canales abierto (a, b) y ambos canales abiertos ($a+b$).

B.- Registro Idealizado de un canal que se puede abrir con dos subestados de conductancia. Los niveles de corriente correspondientes a los dos subestados de conductancia están señalados en el extremo derecho del registro como a' y a'' para los estados más y menos conductor, respectivamente, e nivel de corriente correspondiente al canal cerrado esta indicado por una línea horizontal en el extremo derecho del registro.

Intermedio; señalado como a").

ii.- En un registro con dos canales diferentes, se espera observar con muy baja frecuencia un cambio en la corriente desde el nivel que corresponde a los dos canales abiertos hacia el nivel que corresponde a los dos canales cerrados. Esto es lo que se aprecia en la figura 3.5A en que no se aprecia ninguna transición de este tipo. En cambio, en un canal con subestados, es posible observar transiciones desde cualquiera de los niveles de corriente hasta el estado cerrado (figura 3.5b).

Por lo tanto, la distinción entre dos canales diferentes y canales con dos estados de conductancia se hace a través de la aplicación conjunta de los criterios i y ii.

3.2.1.1 Los canales de la preparación hecha en la ausencia de inhibidores de proteasas muestran un subestado de mayor conductancia.

En la figura 3.6A se observa un registro de corriente de canal único en NaCl 200 mM en ambos lados de la bicapa a -90 mV. A la derecha del registro de corriente, se indican los niveles de corriente para el canal cerrado (una línea horizontal) y los niveles de corriente que corresponden a los estados de mayor y menor conductancia del canal (señalados con una línea horizontal y el símbolo $gama_1$ y $gama_2$, respectivamente). La secuencia de eventos que muestra la figura 3.6A es la siguiente: Al comienzo del registro (izquierda), la amplitud de la corriente que pasa a través del canal es $\approx 1,0$ pA. El canal se cierra pasando al estado no conductor y luego se abre con una amplitud de $\approx 1,0$ pA para pasar a un estado más conductor en el que la corriente que pasa a través de él es $\approx 1,5$ pA. Posteriormente, el canal se cierra y se abre hacia el estado más conductor y retorna al estado menos conductor. Esta clase de registros sólo se explica suponiendo un solo canal con dos estados distintos de conductancia, pues, si fueran dos canales distintos, es muy improbable que ambos se cierren y se habran simultáneamente.

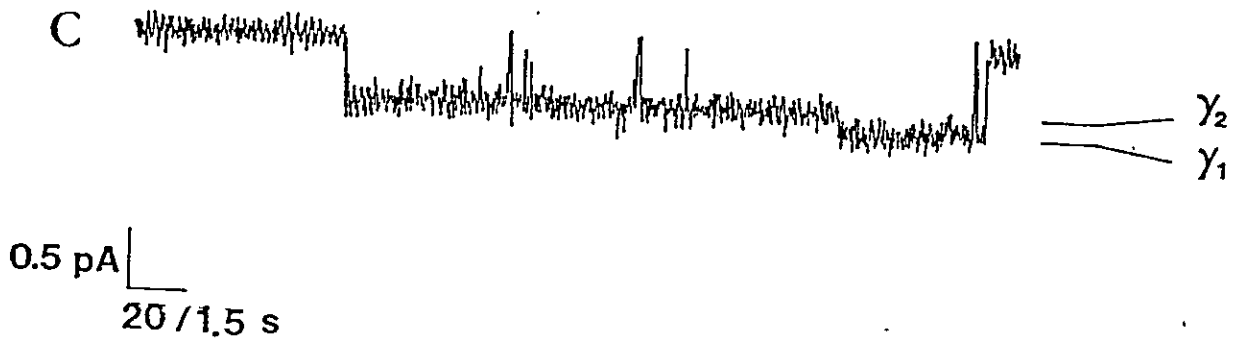
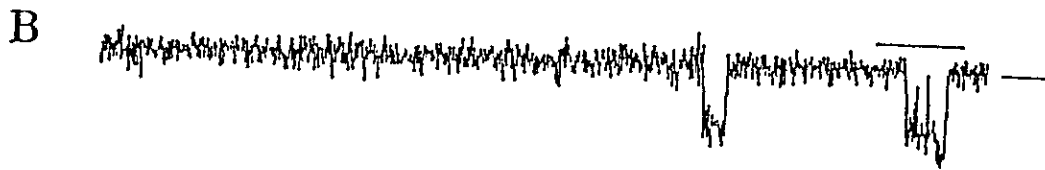
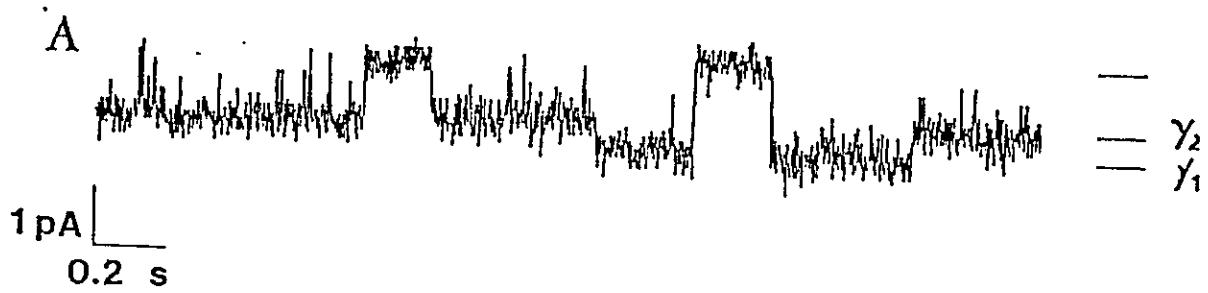
De aquí en adelante, llamaremos $gama_1$ y $gama_2$ a los estados más y menos conductor de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas, respectivamente.

Figura 3.6. Los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas tienen un subestado de mayor conductancia.

A.- Registro de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas a -90 mV, en presencia de NaCl 200 mM en ambos lados de la bicapa, y BTX 100 nM. Las líneas al costado derecho del registro indican los niveles de corriente correspondientes al canal cerrado, al estado menos conductor ($gama_2$) y al estado más conductor ($gama_1$), respectivamente. Registro filtrado a 100 Hz (-3 dB).

B.- Registro de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas a -40 mV, en presencia de NaCl 400 mM en ambos lados de la bicapa, BTX 100 nM y TTX 33 nM. La línea horizontal al costado derecho del registro indica el nivel de corriente correspondiente al canal cerrado. La línea horizontal sobre el registro indica una apertura del canal en la que sucede una transición hacia un estado más conductor. Filtro 50 Hz (-3 dB).

C.- Registro expandido del sector marcado por la línea horizontal en la figura B. Las líneas al costado derecho del registro indican los niveles de corriente correspondientes al estado más conductor y menos conductor, $gama_1$ y $gama_2$, respectivamente. Filtro 50 Hz (-3 dB).



El trazo de la figura 3.6B muestra un registro de canal único tomado a -40 mV y en presencia de NaCl 400 mM en ambos lados del canal y tetrodotoxina (TTX) 33 nM en el lado externo. La TTX induce cierres del canal que se pueden prolongar por centenas de segundos. Los niveles de corriente correspondientes al canal cerrado y los dos estados de conductancia, $gama_1$ y $gama_2$, se indican con una línea horizontal en el extremo derecho del registro. La secuencia de eventos de este registro es la siguiente: Después de una permanencia > 3 minutos en el estado bloqueado (no conductor), el canal se abre, abandonando el estado bloqueado, por aproximadamente 10 segundos, llevando una corriente de $\approx 0,5$ pA ($gama_2$), siendo nuevamente bloqueado por un periodo cercano a un minuto; se abre durante 15 segundos para pasar nuevamente al estado bloqueado. Notese que en la última transición al estado abierto, se produce una transición hacia un estado más conductor ($\approx 0,7$ pA, $gama_1$). Esto se observa más claramente en el trazo de la figura 3.6c, que es una expansión en el tiempo del sector marcado con la barra horizontal del registro de la figura 3.6B. En este trazo se aprecia que el canal se abre llevando una corriente de $\approx 0,5$ pA ($gama_2$) sufriendo luego una transición hacia un estado más conductor ($\approx 0,7$ pA; $gama_1$), se cierra completamente, se abre y finalmente se bloquea con TTX. Este registro muestra que se trata de un solo canal pues, tanto el evento breve de cierre que se observa al final de la apertura, como de bloqueo con TTX son muy poco probable de haber ocurrido simultáneamente en dos canales diferentes.

Esta clase de registros son muy escasos. En estas condiciones iónicas, solo se observó la aparición del subestado $gama_1$ en 2 de un total de 46 bicapas con canales de sodio modificados.

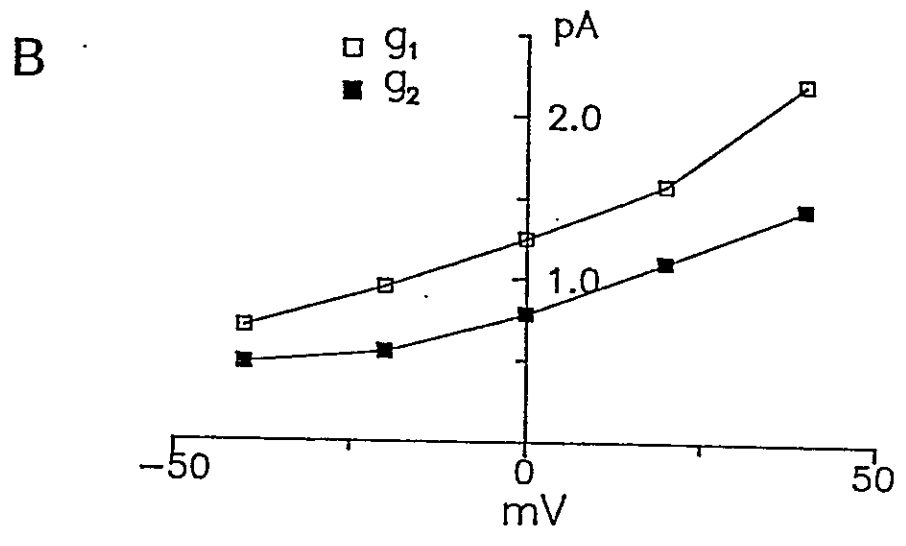
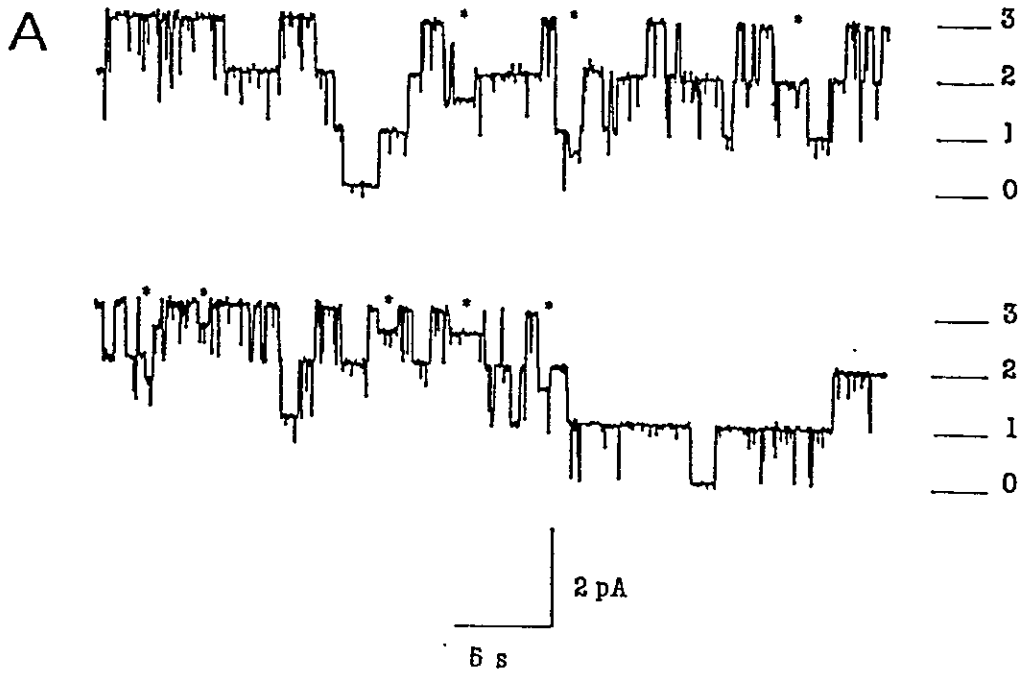
3.2.1.2 Los canales de la preparación hecha en la presencia de inhibidores de proteasas muestran un subestado de menor conductancia.

La figura 3.7A muestra un registro continuo de tres canales en presencia de NaCl 200 mM en el lado interno y 5 mM Mops-NaOH en el lado externo. A la derecha de este registro se señala con líneas horizontales el número de canales abiertos simultáneamente. En este registro se observan transiciones desde el estado abierto hacia un estado menos conductor (marcadas con

Figura 3.7. Los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas tienen un subestado de menor conductancia.

A.- Registro de corriente de tres canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas. El registro fue tomado en presencia de NaCl 200 mM en el lado interno y Mops-NaOH pH 7.5 mM en el lado externo. Las líneas horizontales indican los niveles de corriente correspondiente a 0, 1, 2 y 3 canales abiertos simultáneamente (señalados con los respectivos números). Los asteriscos sobre el registro señalan el instante en que uno de los canales se encuentra en el estado menos conductor. La duración del registro es de tres minutos. Filtro 20 Hz (-3 dB). Las transiciones del orden de los segundos que se observan en este registro son espontáneas, por cuanto, en ninguno de los compartimientos de la cámara estaba presente un antagonista de canales de sodio.

B.- Relaciones corriente-voltaje para los dos estados de conductancia del experimento de la figura A. Los cuadrados blancos y negros corresponden a los estados de mayor (g_1) y menor conductancia (g_2), respectivamente. Las conductancias de los subestados, medidas en el intervalo ± 20 mV, son 16 y 12 pS, para los estados g_1 y g_2 , respectivamente.



un asterisco). La corriente que pasa por el estado abierto es $\approx 1,25$ pA y la del subestado es de $\approx 0,8$ pA. Dadas las condiciones iónicas, los saltos de $\approx 0,45$ pA indicados por los asteriscos pueden deberse a la presencia de un canal aniónico que al abrirse conduce corriente de signo opuesto a la del canal de sodio. Esto no es así, pues, de la figura 3.7B se observa que las relaciones corriente-voltaje para las dos conductancias (cuadrados blancos y negros para los estados más y menos conductor, respectivamente), convergen hacia potenciales de inversión menores que -50 mV, indicando que ambas conductancias son catiónicas. Las conductancias a 0 mV para los estados más y menos conductores son de 16 y 12 pS, respectivamente. Este tipo de transiciones solo se observó en 3 de un total de 55 experimentos hechos con esta preparación. A los subestados de mayor y menor conductancia de esta preparación, les llamaremos g_1 y g_2 , respectivamente.

Por otra parte, es interesante destacar que las razones de corriente g_{ama_1}/g_{ama_2} y g_1/g_2 son similares, g_{ama_1}/g_{ama_2} es $1,45$ y $1,48$ para los registros de la figura 3.6A y 3.6C, respectivamente y g_1/g_2 es $1,51$ para el registro de la figura 3.7. Además, ambos valores son muy parecidos a la razón entre los promedios de conductancia de los estados predominantes de ambas preparaciones: $g_1/g_{ama_2} = 1,46$ (sección 3.1.2).

3.2.2 Curva conductancia vs. [Na] de los canales de la preparación hecha en ausencia de Inhibidores de proteasas.

En la gran mayoría de los canales iónicos la conductancia es una función saturante de la concentración del ion transportado y la manera en que la conductancia del canal depende de la concentración entrega información sobre el mecanismo de conducción de un determinado ion a través del canal (Hille, 1975 a y b; Cecchi y cols., 1981; Latorre y Miller, 1983). Por esta razón, uno de los pasos necesarios para entender el mecanismo de conducción de iones de un canal dado, ha sido estudiar la conductancia iónica como función de la concentración del ion transportado (Hille, 1984). En todos los estudios de conducción de canales de sodio incorporado a bicapas se ha utilizado esta estrategia como condición necesaria para establecer las características del sistema de conducción iónica del canal (Moczydlowski y cols., 1984a; Green y cols., 1987a; Behrens y cols.,

1989). Con este objetivo se estudió la conductancia del canal en un amplio intervalo de concentraciones de sodio.

3.2.2.1 A bajas concentraciones de sodio el subestado γ_1 se observa con mayor frecuencia.

Un hallazgo importante derivado de este estudio fue que a bajas concentraciones de sodio, el subestado más conductor de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas (γ_1) aparece con una frecuencia mucho mayor que en NaCl 200 mM, más aún, en algunos experimentos a muy baja concentración de sodio este subestado se hizo predominante. Estos resultados se resumen en las siguientes figuras:

La figura 3.8A muestra un registro de corriente de dos canales tomado a -35 mV en Na^+ 3 mM en ambos lados de la bicapa y en presencia de 0,6 nM de decarbamoilsaxitoxina (dc-STX) en el lado externo. La dc-STX es una toxina que induce cierres del canal que duran algunos segundos. El nivel de corriente correspondiente a los dos canales en el estado no conductor (bloqueado por la dc-STX) está indicado por una línea horizontal en el extremo derecho de los registros. En esta figura se muestra que los canales se pueden abrir con dos amplitudes de corriente distintas. La figura 3.8B muestra registros expandidos en el tiempo de las regiones marcadas con una línea horizontal y denominadas I y II. En estos registros se observa claramente que los canales se pueden abrir a dos amplitudes distintas (señaladas con una línea horizontal y los símbolos γ_1 , γ_2 y $\gamma_1 + \gamma_2$ en el extremo derecho de los registros). De estos dos canales, probablemente uno de ellos estaba con la configuración menos conductora, pues, aproximadamente 10 min después de tomar el registro de la figura 3.8A, uno de los canales desapareció del registro, quedando sólo un canal. El canal que permaneció en la bicapa estaba estabilizado en la conformación más conductora (γ_1), esto se aprecia en la figura 3.8C, que muestra un registro del canal que quedó en la bicapa, este registro fue hecho en las mismas condiciones de la figura 3.8A (Nótese la diferencia en la escala temporal usada).

Para medir las corrientes de los dos estados de conductancia, se procedió a separar las conductancias analizando las distribuciones de amplitudes de corriente, esto está ejemplificado en

Figura 3.8. Presencia de subestados a bajas concentraciones de sodio.

A.- Registro de corriente de dos canales en presencia de Na^+ 3 mM en ambos lados de la bicapa. El potencial aplicado es de -35 mV. La línea horizontal al costado derecho del registro representa el nivel de corriente cuando los dos canales no conducen. Las sectores marcados con I y II corresponden a sectores en que los canales se abren con distinta amplitud. En este experimento las transiciones fueron inducidas por la presencia de 0,6 nM dc-STX. Filtro 8 Hz (-3 dB).

B.- Registros expandidos 16 veces de las regiones marcadas con I y II de la figura A. Las líneas al costado derecho de los registros indican los niveles de corriente correspondientes a ambos canales en el estado bloqueado por dc-STX, cuando el nivel de corriente corresponde al estado más y menos conductor (g_{ama_1} y g_{ama_2} , respectivamente), y cuando ambos estados de conductancia están presentes simultáneamente ($g_{\text{ama}_1} + g_{\text{ama}_2}$).

C.- Registro del mismo experimento de los paneles A y B, tomado 10 minutos después que el registro de la figura A. Uno de los dos canales desapareció del registro y solo se registro un canal, la amplitud de la corriente que lleva este canal corresponde al subestado más conductor (g_{ama_1}). Notese que durante los cuatro minutos que dura este registro, no se observa ninguna transición de amplitud diferente, esto indica que en el registro de la figura A, las distintas amplitudes que se observan se deben a que los dos canales tienen diferente conductancia. Filtro 5 Hz (-3 dB).

A

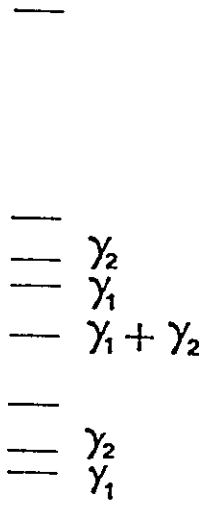
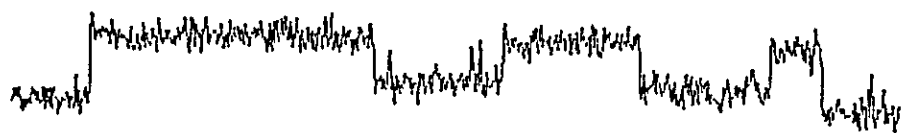


B

I



II



.25 pA |
10 / 0.5 s

C



.25 pA |
15 s

la figura 3.9A. Esta figura muestra histogramas de amplitudes de los saltos de corriente a distintos voltajes para un experimento como el que muestra el registro del figura 3.8. En cuatro de los seis potenciales estudiados en este experimento, se aprecian claramente dos picos en la distribución de amplitudes. Las curvas puestas sobre las distribuciones de amplitudes representan el ajuste con una curva teórica de una distribución compuesta de dos curvas normales. En la figura 3.9B se grafican los promedios de la corriente entregados por el ajuste de dos curvas normales a las distribuciones de la figura 3.9A. Las conductancias para los dos subestados en estas condiciones son 7,9 y 5,5 pS para $gama_1$ y $gama_2$, respectivamente. La razón $gama_1/gama_2 = 1,45$. Notese que, a cada voltaje, las razones de corriente se mantiene relativamente constante (ver la leyenda de la figura 3.9A). Con este tipo de análisis se puede estudiar como depende la conductancia de los dos subestados en función de la concentración de sodio.

Para ejemplificar que la frecuencia con que aparece el estado más conductor decrece al aumentar la concentración de sodio, en la figura 3.10 se muestra la relación entre la conductancia promedio del canal y la concentración de sodio a bajas concentraciones de sodio en tres experimentos. En estos experimentos se determinó la corriente promedio de a lo menos cinco transiciones ocurridas a cada voltaje. La conductancia calculada a partir de la pendiente se grafica en función de la concentración de sodio en la figura 3.10. Para dos de estos tres experimentos (señalados con círculos blancos y cuadrados negros, respectivamente) se aprecia la existencia de un intervalo de concentraciones de sodio en el que, a pesar de que la concentración de sodio aumenta, la conductancia decrece. Además, en uno de estos experimentos (señalado con círculos negros), el canal permaneció en el estado de conductancia menor durante todo el experimento.

Estos resultados muestran:

- Que el estado más conductor ($gama_1$) se hace menos frecuente a medida que crece la concentración de sodio, y explica la baja frecuencia con que este subestado aparece en 200 mM de sodio en los canales provenientes de esta preparación.

- El intervalo de concentraciones en el cual el estado de mayor conductancia puede hacerse predominante se encuentra entre 400 μ M y 15 mM.

Figura 3.9. Relaciones corriente-voltaje obtenidas a partir de los histogramas de frecuencia de amplitudes.

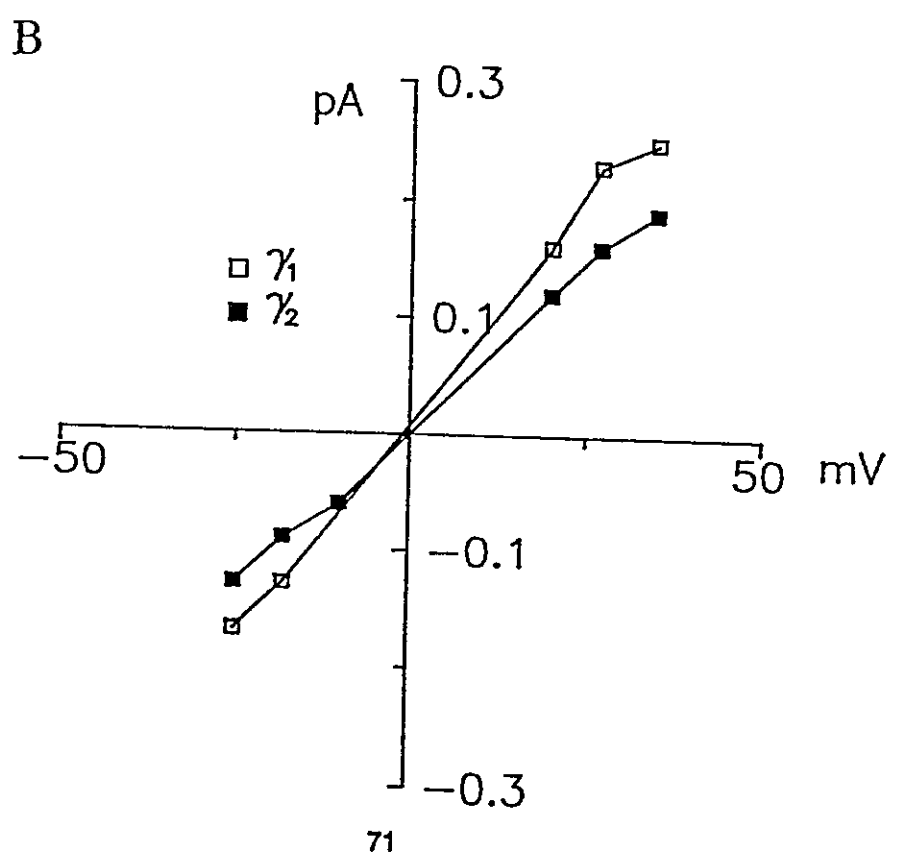
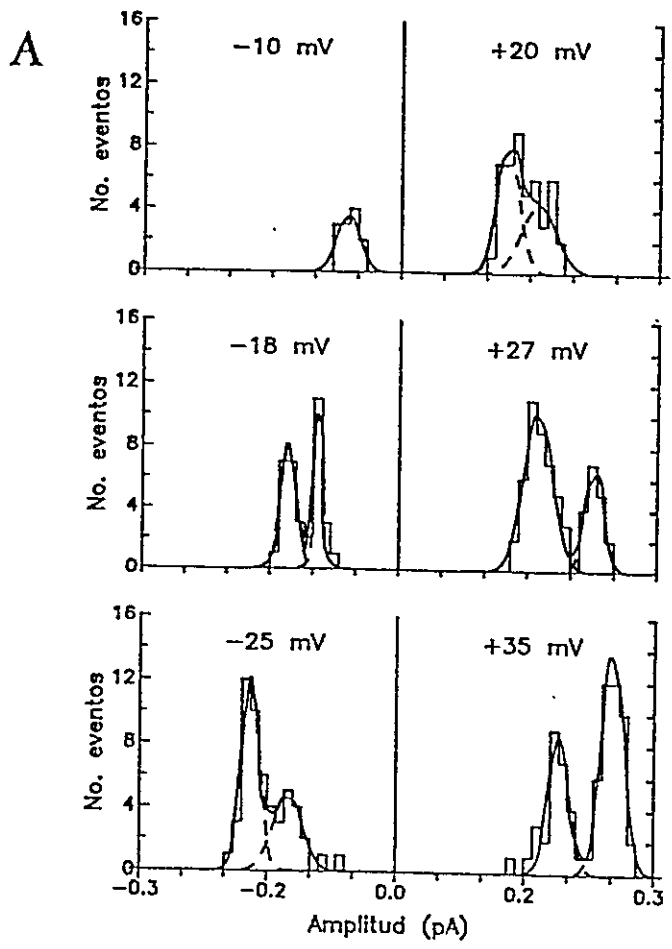
A.- Histogramas de frecuencias de amplitudes de eventos de apertura o cierre cuya duración fue mayor que 100 ms. La línea continua sobre las distribuciones fueron dibujadas con la ecuación que representa la suma de dos distribuciones normales:

$$N_1/s_1\sqrt{2\pi} \exp\{-1/2[(I-I_1)/s_1]^2\} + N_2/s_2\sqrt{2\pi} \exp\{-1/2[(I-I_2)/s_2]^2\},$$

en que I , corresponde a la amplitud de corriente medida, N_1, I_1 y s_1 corresponden al número de eventos, la corriente promedio y la desviación típica de los valores de la distribución de la población de mayor amplitud. N_2, I_2 y s_2 corresponden al número de eventos, la corriente promedio y la desviación típica de la distribución de eventos de menor amplitud. La línea discontinua representa a cada uno de los dos componentes en la distribución, Para cada voltaje los valores de los parámetros son los siguientes:

voltaje (mV)	N_1	I_1	s_1	N_2	I_2	s_2	I_1/I_2
35	43	0,257	0,012	29	0,190	0,017	1,35
27	18	0,233	0,016	43	0,169	0,016	1,38
20	15	0,173	0,012	31	0,135	0,018	1,28
-10	--	--	--	12	-0,060	0,011	--
-18	17	-0,134	0,008	18	-0,100	0,001	1,35
-25	44	-0,178	0,014	18	-0,124	0,020	1,43
					Promedio I_1 / I_2 :		$1,36 \pm 0,05$

B.- Relación corriente-voltaje obtenida a partir de los histogramas de frecuencias de amplitudes. Los cuadrados blancos y negros corresponden a los estados de mayor y menor conductancia respectivamente.



- La razón entre las dos conductancias es aproximadamente constante, en el intervalo de concentraciones estudiado y es: $gama_1/gama_2 \approx 1,4$.

- En la familia de curvas de conductancia correspondiente a $gama_2$, es notable que, a pesar de que el intervalo de concentraciones de sodio recorre más de un orden de magnitud (desde 2 mM hasta 32 mM), la conductancia de $gama_2$ crece $\approx 30\%$, más aún la conductancia en 2 mM de este subestado es solo un 50% menor que en 200 mM de Na^+ .

- Ambas familias de curvas ($gama_1$ y $gama_2$) parecen tender a intersectar la ordenada. La forma de estas curvas se aparta completamente de lo que se espera para el mecanismo más simple de conducción con un solo ion a la vez (Hille, 1975a; Latorre y Miller, 1983; Cecchi y cols., 1981) y sugieren la presencia de cargas negativas en la superficie del canal (Moczydlowski y cols., 1985; Green y cols., 1987a). En la sección 3.2.4 se vuelve a discutir esta observación.

3.2.3 A bajas concentraciones de sodio, las relaciones corriente-voltaje son sublineales.

3.2.3.1. Canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas.

La figura 3.11A muestra las relaciones corriente-voltaje para el subestado más conductor de los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas (g_1). Estas relaciones corriente-voltaje fueron tomadas en $[Na^+]$ igual a 2, 200 y 3000 mM (que en actividades, a_{Na^+} corresponden a 2, 148 y 2321 mM, respectivamente; métodos sección 2.5.1.3.3; Villarroel y cols., 1991), ellas son representadas por círculos blancos, cuadrados blancos y cuadrados negros, respectivamente. Las líneas continuas fueron trazadas a partir de los valores de corriente que se obtuvieron con el modelo de barreras de la figura 3.14 y los parámetros para $gama_1$ de la tabla 3.2. En la figura 3.11A, se observa que la relación corriente-voltaje en Na^+ 2 mM es claramente sublineal a potenciales mayores que 45 mV, en cambio, las relaciones corriente-voltaje en 200 y 3000 mM se observan lineales en todo el intervalo de voltajes estudiado. (Nótese que, en 200 y 3000 mM, las curvas calculadas con el modelo de barreras son levemente superlineal y sublineal, respectivamente). Las conductancias en 200 y 3000 mM de los canales mostrados en la figura fueron determinadas a partir de una regresión lineal de los valores de corriente obtenidos

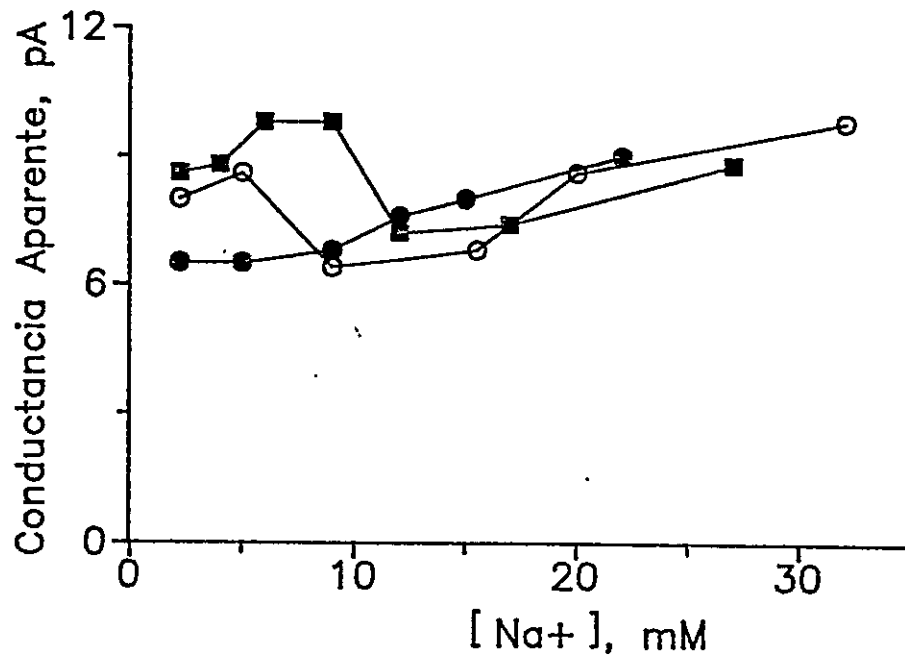


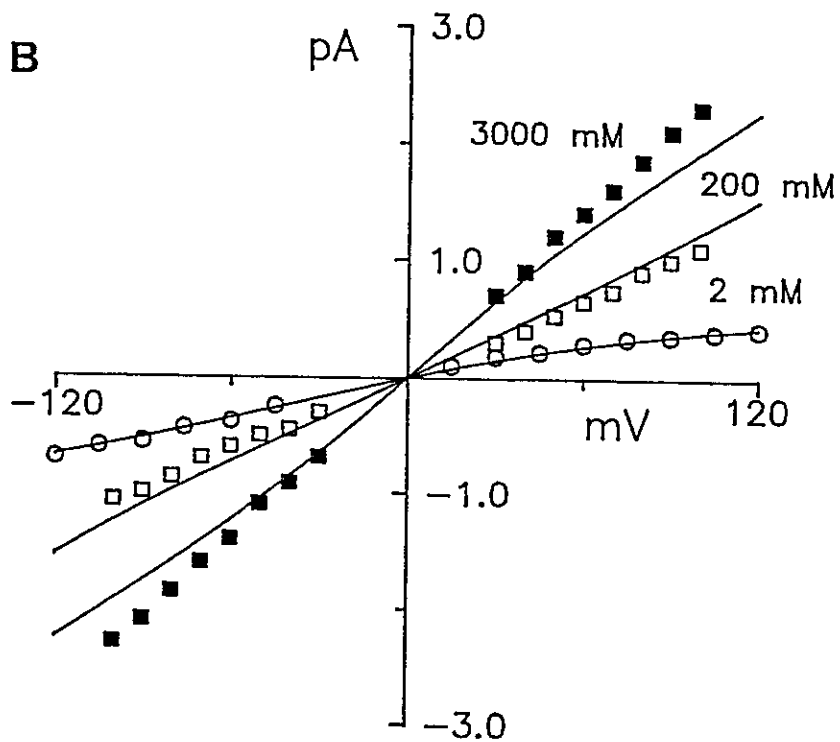
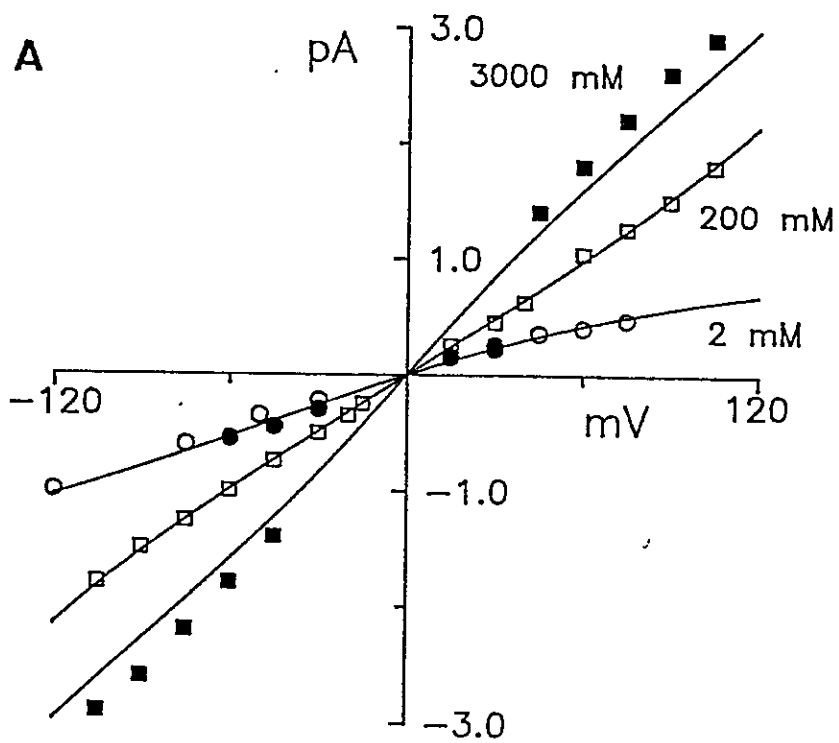
Figura 3.10. Conductancia promedio de todos los eventos de apertura o cierre a vs. [Na⁺].

Gráfico que representa tres experimentos en los que la conductancia del canal se determinó a partir de una regresión lineal de todas las amplitudes medidas a cada potencial. Notese que en dos de los experimentos (círculos blancos y cuadrados negros), en el intervalo comprendido entre 5 y 15 mM, la conductancia promedio decrece al aumentar la concentración de sodio. Los valores de corriente corresponden al promedio de a lo menos cinco transiciones.

Figura 3.11 Relaciones corriente-voltaje para los canales de ambas preparaciones.

A.- Relaciones corriente voltaje para el subestado más conductor de los canales provenientes de ambas preparaciones. Los círculos negros corresponden al subestado más conductor de la preparación hecha en ausencia de Inhibidores de proteasas (g_{a_1}) en 2 mM Na^+ , los círculos blancos, cuadrados blancos y cuadrados negros corresponden a experimentos realizados con canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas (g_1) en $[\text{Na}^+] = 2, 200, 3000$ mM (que en $a_{\text{Na}} = 2, 148$ y 2321 mM, respectivamente). Las líneas continuas fueron trazadas a partir del cálculo de corriente con el modelo de barreras de la figura 3.14 y los parámetros de g_{a_1} puestos en la tabla 3.2.

B.- Relaciones corriente voltaje para el subestado menos conductor de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas (g_{a_2}). Los círculos blancos, cuadrados blancos y cuadrados negros corresponden a experimentos realizados en $[\text{Na}^+] = 2, 200, 3000$ mM (que en $a_{\text{Na}} = 2, 148$ y 2321 mM, respectivamente). Las líneas continuas fueron trazadas a partir del cálculo de corriente con el modelo de barreras de la figura 3.14 y los parámetros de g_{a_2} en la tabla 3.2. La relación corriente-voltaje en Na^+ 2 mM fue usada para ajustar las densidades de carga superficial interna y externa que se muestran en la tabla 3.2 (σ_{in} y σ_{ex} , respectivamente).



entre ± 100 mV, estos valores son 16,8 y 29,0, respectivamente. Para 2 mM, se obtuvo una conductancia de 7,3 que fue calculada a partir de los valores de corriente entre ± 60 mV.

Debido a la baja frecuencia de aparición del subestado menos conductor de los canales de esta preparación (g_2), en este trabajo no fué posible estudiar sistemáticamente las relaciones corriente-voltaje para este subestado, sin embargo, las relaciones corriente voltaje de g_1 y g_2 , mostradas en la figura 3.7B, muestran gran similitud y la razón de corriente entre los subestados se mantienen relativamente constantes en el intervalo ± 40 mV. De los cinco potenciales estudiados, el promedio de las razones de corriente g_1/g_2 es $1,54 \pm 0,05$, y los valores máximo y mínimo fueron 1,58 y 1,46, respectivamente.

3.2.3.2. Canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas.

En la figura 3.11A, la relación corriente-voltaje mostrada con círculos negros corresponde al subestado más conductor, g_{max} , de los canales obtenidos de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas, esta relación corriente-voltaje fué obtenida en 2 mM Na^+ en ambos lados del canal, y la conductancia medida entre -60 y +45 mV es 7,4 pS. Se puede apreciar que existe bastante superposición con la curva I-V del estado más conductor de los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas tomadas a 2 mM de sodio. Para g_{max} , la curva I-V obtenida a mayor concentración fué en 60 mM de NaCl (no mostrada), esta relación corriente-voltaje es lineal y su conductancia fué 13,8 pS.

La figura 3.11B muestra las relaciones corriente-voltaje para el estado menos conductor de los canales obtenidos en ausencia de inhibidores de proteasas (g_{min}). Estas relaciones corriente-voltaje fueron obtenidas en Na^+ 2, 200 y 3000 mM. Se puede apreciar la sublinealidad de la curva obtenida en Na^+ 2 mM (círculos blancos) a potenciales mayores que 60 mV, en cambio, las curvas obtenidas en 200 y 3000 mM se observan lineales en todo el intervalo de voltajes estudiado. Las conductancias de los canales de la figura 3.11B (medidas entre ± 60 mV para la curva en 2 mM y entre ± 100 mV para las curvas a 200 y 3000 mM) son 5,5, 10,7 y 23,1 pS para 2, 200 y 3000 mM Na^+ , respectivamente. Las líneas continuas corresponden al cálculo de las corriente con el modelo

e barreras de la figura 3.14 y los valores de la tabla 3.2 correspondientes a $gama_2$ (Nótese que, en 200 y 3000 mM, las curvas calculadas con el modelo de barreras son levemente superlineal y sublineal, respectivamente).

3.2.3.3 La razón de conductancia $g_1/gama_2$ es constante en el intervalo 2 - 3000 mM.

De las relaciones corriente-voltaje mostrada en la figura 3.11 es posible medir las razones de conductancia, $g_1/gama_2$ en el intervalo de actividades de Na^+ 2-3000 mM. Los valores medidos de $g_1/gama_2$ son: 1,33, 1,57 y 1,25 para 2, 200 y 3000 mM respectivamente.

Estos resultados tienen en común que en Na^+ 2 mM las curvas son sublineales en el sector de los potenciales positivos, característica que desaparece a concentraciones mayores de Na^+ . Estos resultados indican que en los sistemas de conducción, tanto de $gama_1$, como de $gama_2$ y g_1 , existe un componente asimétrico que sólo es importante a bajas concentraciones de sodio. Este componente asimétrico puede ser explicado por una desigual distribución de cargas fijas entre las caras interna y externa del canal (Latorre y cols., 1991).

3.2.4 La relación entre la conductancia y la concentración de sodio de los estados más conductores de ambas preparaciones son iguales.

Ya que la modulación de la conductancia mediada por cargas fijas en sus entradas se manifiesta más claramente mientras más baja sea la fuerza iónica (ecuación 2.8), el intervalo de concentraciones de Na^+ se extendió hasta 0,4 mM. En la figura 3.12 se resumen todos los resultados de las mediciones de conductancia vs. $[Na^+]$ obtenidas de los experimentos hechos con los canales provenientes de las preparaciones hechas en ausencia y en presencia de inhibidores de proteasas.

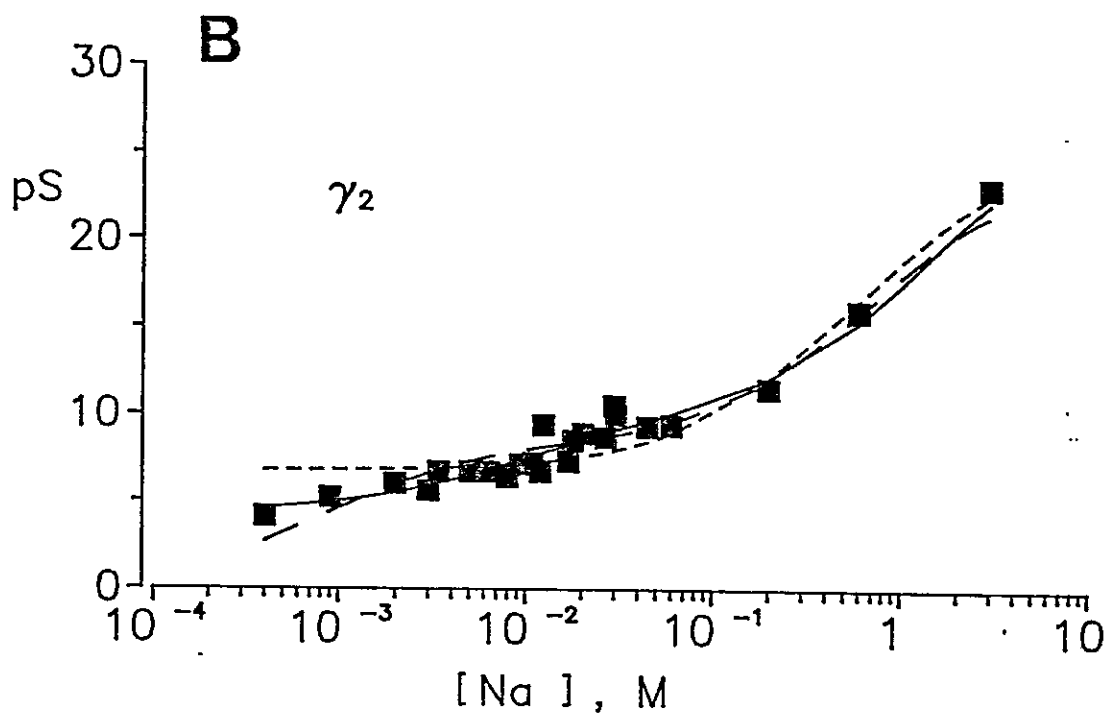
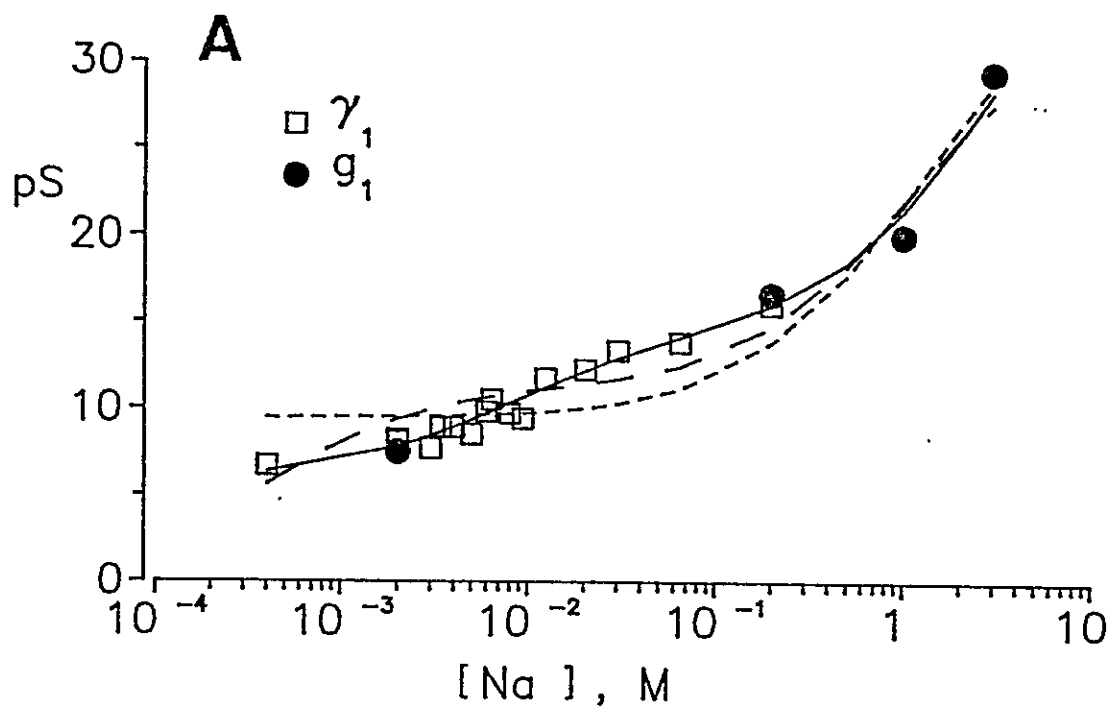
De los resultados de la figura 3.11 se aprecia para las tres familias de conductancia mostradas que, a pesar de que el intervalo de actividades de sodio se modifica en tres ordenes de magnitud, la conductancia de los canales cambia ≈ 4 veces. Este observación se aprecia mejor en las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ mostradas en la figura 3.12. Esta figura representa las

Figura 3.12. Relación de conductancia vs. $[Na^+]$ para los subestados de conductancia de ambas preparaciones.

A.- Relación de conductancia vs. $[Na^+]$ para el subestado más conductor de los canales provenientes de ambas preparaciones. Los círculos negros y los cuadrados blancos corresponden experimentos hechos con canales provenientes de las preparaciones hechas en presencia (g_1) y en ausencia de inhibidores de proteasas (g_{a1}), respectivamente.

B.- Relación de conductancia vs. $[Na^+]$ para el subestado menos conductor de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas (g_{a2}).

Para ambos paneles, las líneas que se encuentran sobre los valores experimentales corresponden a los ajustes del modelo de barreras de la figura 3.14 y los parámetros de la tabla 3.1. Estas líneas corresponden a las siguientes condiciones: el canal permite, como máximo, un ion en la vía de conducción y presenta cargas negativas en la superficie (línea discontinua de trazos cortos). El canal permite ocupación doble y no presenta cargas negativas en la superficie (línea discontinua de trazos largos). El canal permite ocupación doble y, además, presenta cargas negativas en la superficie.



relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$, en el intervalo 0,4 y 3000 mM Na^+ , para los dos subestados de conductancia de los canales provenientes de ambas preparaciones.

La figura 3.12A muestra la relación de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ para los subestados más conductores, g_{ama_1} (representados por cuadrados blancos) y g_1 (representados por círculos negros). En esta figura se aprecia que la familia de valores de conductancia correspondientes a g_1 se superpone con la familia de valores de conductancia del subestado g_{ama_1} .

La figura 3.12B muestra la relación de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ para el subestado menos conductor de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas, g_{ama_2} (representados por cuadrados negros).

En vista de: i.- la gran superposición que muestran las relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ para g_{ama_1} y g_1 , ii.- que los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas exhiben un subestado, g_2 , cuya conductancia es similar a la conductancia correspondiente a g_{ama_2} (secciones 3.2.1.2 y 3.2.3.1), iii.- que independientemente de las condiciones experimentales, las razones de conductancia y de corriente, $g_{\text{ama}_1}/g_{\text{ama}_2}$, g_1/g_2 y g_1/g_{ama_2} se mantienen relativamente constantes. Es posible postular que $g_{\text{ama}_1}=g_1$ y $g_{\text{ama}_2}=g_2$, así, los estados más frecuentes de cada preparación, es decir g_{ama_2} en el caso de canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas, y g_1 en el caso de los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas, representan dos estados conformacionales de la proteína, cuya estabilización depende de a) la presencia o ausencia de inhibidores de proteasas en el proceso de obtención de membranas y b) la concentración de sodio. De aquí en adelante, se considera que g_{ama_1} y g_1 comparten un mismo mecanismo de conducción iónica, por esta razón, en los estudios que siguen a continuación, los valores de conductancia correspondientes a g_{ama_1} y g_1 son agrupados en una sola familia de resultados experimentales sin importar de cual preparación provienen. A esta familia le llamaremos g_{ama_1} .

En la figura 3.12 resulta sorprendente que, tanto en la parte A como en la parte B, ambas relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$, en vez de seguir decreciendo con la concentración de sodio,

parecen tener una asíntota horizontal a muy bajas concentraciones. Esta clase de resultados son teóricamente esperables si en la superficie del canal existen cargas negativas que concentran iones a la entrada del sistema de conducción, pues, en este caso, la concentración superficial de sodio tiende a un valor mínimo distinto de cero (Green y cols., 1987a, Latorre y cols., 1991). Otra característica de los dos subestados de conductancia es que ambos poseen curvas de conductancia vs. $[Na^+]$ con una forma similar, excepto excepto por un factor de escala que se mantiene relativamente constante a lo largo de todo el intervalo de concentraciones estudiado.

En la figura 3.12, las líneas sobre las dos relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ corresponden al ajuste del modelo de barreras mostrado en la figura 3.14 con los parámetros presentados en la tabla 3.1. Tanto para la parte A como para la parte B, las líneas discontinuas de trazos largos corresponden al ajuste de un modelo de conducción en que el canal permite ocupación doble. Las líneas discontinuas de trazos cortos corresponden al ajuste de un modelo en que el canal permite un solo ion y posee cargas negativas a la entrada del sistema de conducción. La línea continua corresponde al ajuste de un modelo en que el canal tiene cargas en la superficie y permite ocupación doble.

3.2.4 γ_1 y γ_2 tienen la misma razón de permeabilidades P_{Li}/P_{Na} y P_{Cs}/P_{Na} .

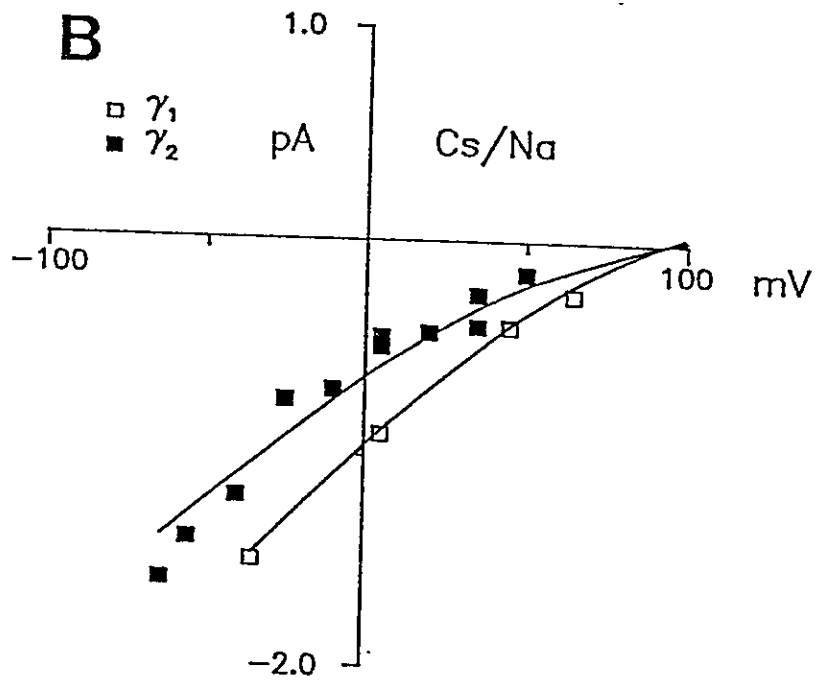
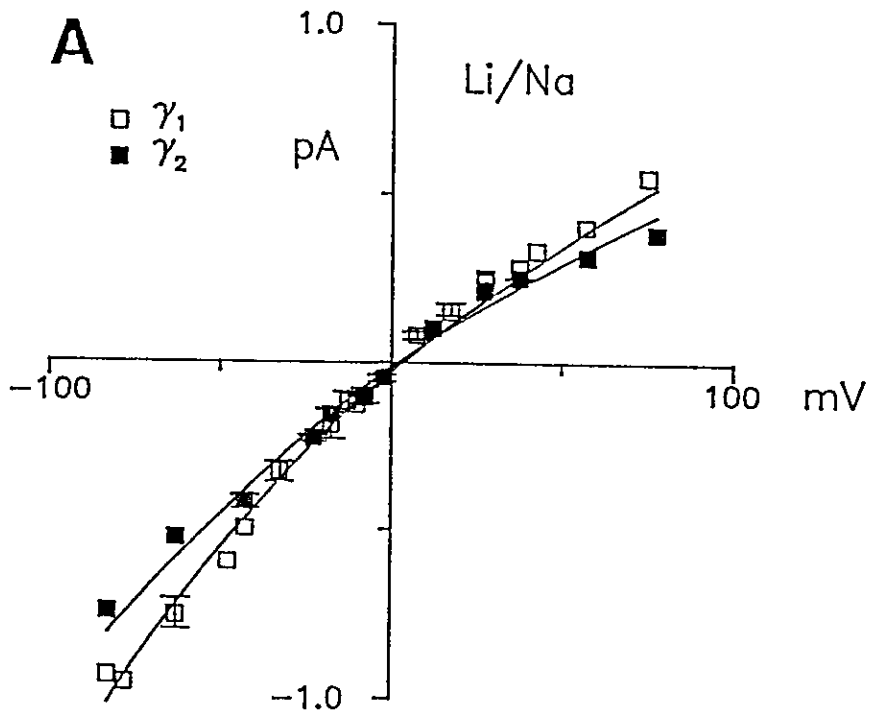
Los canales de sodio son muy permeables al ion litio y poco permeables al ion cesio. Dependiendo de la preparación estudiada, los canales no modificados por BTX muestran razones de permeabilidades P_{Li}/P_{Na} entre 0,93 y 1,1 y P_{Cs}/P_{Na} entre 0,013 y 0,016 (Hille, 1984). Por esta razón, en este trabajo, Li^+ y Cs^+ fueron utilizados como sondas para determinar en qué se diferencian los sistemas de conducción de los dos estados de conductancia γ_1 y γ_2 .

En la figura 3.13 se muestran las relaciones corriente-voltaje en condiciones bliónicas a 200 mM de concentración de las sales de cloruro de sodio, litio y cesio. En estos experimentos el NaCl está presente en el lado extracelular del canal, y en el lado intracelular del canal se puso LiCl o CsCl (estas condiciones experimentales son ilustradas en la figura 3.13 como Li/Na y Cs/Na, respectivamente).

Figura 3.13. Relaciones corriente-voltaje en condiciones biliónicas.

A.- Relaciones corriente voltaje para γ_{1} y γ_{2} en 200 mM NaCl, Mops-NaOH 5 mM pH 7 en el lado externo y 200 mM LiCl Mops-LiOH 5 mM pH 7 en el lado interno (las actividades para el Na^{+} y el Li^{+} son 0.148 y 0.152 M, respectivamente). Los cuadrados blancos corresponden a tres experimentos realizados con canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas. Los cuadrados negros corresponden a tres experimentos realizados con canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas. Las líneas continuas fueron trazadas a partir del modelo de barreras de la figura 3.14 y los parámetros de γ_{1} y γ_{2} para el Na^{+} y el Li^{+} de la tabla 3.2. En el ajuste de estas curvas, los únicos parámetros ajustables fueron los valores de energía para los picos y los pozos del Li^{+} .

B.- Relaciones corriente voltaje para γ_{1} y γ_{2} en 200 mM NaCl, Mops-NaOH 5 mM pH 7 en el lado externo y 200 mM CsCl Mops-CsOH 5 mM pH 7 en el lado interno (las actividades para el Na^{+} y el Cs^{+} son 0.148 y 0.141 M, respectivamente). Los cuadrados blancos corresponden a un experimento realizados con canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas. Los cuadrados negros corresponden a dos experimentos realizados con canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas. Las líneas continuas fueron trazadas a partir del modelo de barreras de la figura 3.14 y los parámetros de γ_{1} y γ_{2} para el Na^{+} y el Cs^{+} de la tabla 3.2. En el ajuste de estas curvas, los parámetros ajustables fueron los valores de energía para los picos y los pozos del Cs^{+} y los terminos de repulsión electrostática suponiendo $A_{\text{Na-Na}} = A_{\text{Na-Cs}} = A_{\text{Cs-Cs}}$.



La figura 3.13A y 3.13B muestran las relaciones corriente-voltaje en condiciones biliónicas Li/Na y Cs/Na, respectivamente. Los valores de corriente para γ_1 y γ_2 fueron obtenidos con canales obtenidos de la preparaciones hechas en presencia (cuadrados blancos) y en ausencia de inhibidores de proteasas (cuadrados negros), respectivamente. Se puede apreciar que, tanto para la curva en Li/Na, como para Cs/Na, la forma general de las relaciones corriente-voltaje de ambas conductancias son muy parecidas entre sí, excepto por un factor de escala. La línea continua sobre los puntos de ambos gráficos corresponde al ajuste del modelo de barreras de la figura 3.14 con los parámetros de la tabla 3.2 para sodio, litio y cesio.

Para el caso del experimento Li/Na (figura 3.13A), la determinación del potencial de inversión para los valores de ambos estados de conductancia se hizo interpolando la curva de ajuste del modelo de barreras al valor de voltaje para el cual la corriente es igual a 0 pA. Los valores del potencial de inversión obtenidos de esta manera son: 3,7 y 2,5 mV para γ_1 y γ_2 , respectivamente. Los valores de la razón de permeabilidades se obtubieron a partir de la expresión:

$$V_r = 58 \log [(P_X/P_{Na}) (a_X/a_{Na})], \quad (3.2)$$

en que V_r es el potencial de inversión, P_X/P_{Na} es la razón de permeabilidades entre el catión estudiado, X^+ y el Na^+ , a_X y a_{Na} corresponden a las actividades de X^+ y Na^+ , respectivamente. Las actividades de los cationes se obtubieron siguiendo la metodología descrita en Villarroel y cols. (1991; métodos sección 2.5.1.3.3). Las razones de permeabilidad P_{Li}/P_{Na} para γ_1 y γ_2 son 0,80 y 0,84, respectivamente.

A pesar que los valores de las razones de permeabilidad P_{Li}/P_{Na} para los dos subestados de conductancia son cercanos a 1, las relaciones corriente-voltaje se hacen sublineales a potenciales positivos (cuando la corriente es llevada fundamentalmente por el Li^+), esto sugiere que el ion litio pasa a través del canal pero se queda más tiempo retenido en su sistema de conducción.

Para el caso del experimento Cs/Na (figura 3.13B), aún a potenciales mayores que 120 mV, no se registraron corrientes positivas. Por esta razón, la determinación del potencial de inversión se

hizo extrapolando la curva de ajuste con el modelo de barreras de la figura 3.14 y calculando el potencial al cual la corriente es cero, los valores calculados para el potencial de inversión son 93 y 92 mV, para γ_1 y γ_2 , respectivamente. La razón de permeabilidad P_{Cs}/P_{Na} , obtenida a partir de la ecuación 3.2, para ambas conductancias es de 0.026.

Los resultados de los experimentos en condiciones biiónicas Li/Na y Cs/Na muestran que las relaciones corriente-voltaje de γ_1 y γ_2 son muy parecidas, excepto por un factor de escala, estos resultados indican que las diferencias observadas entre los sistemas de conducción de γ_1 y γ_2 para el Na^+ también se observan para el Li^+ y el Cs^+ .

3.2.6 Modelo de barreras de energía.

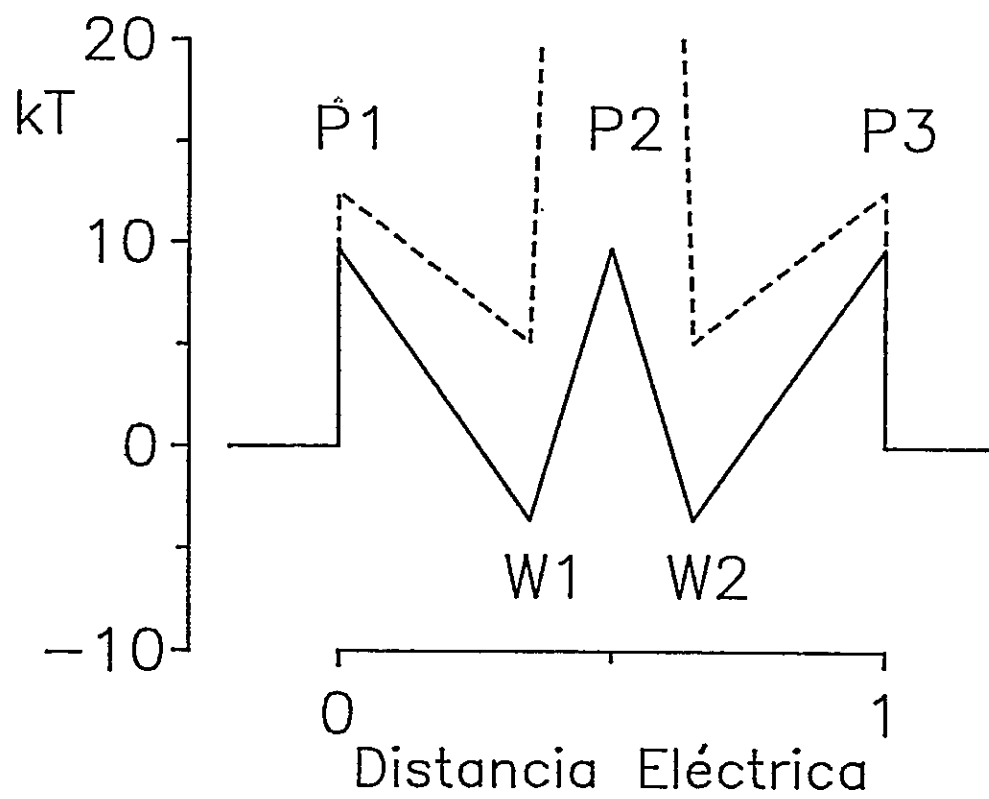
Para describir los resultados de los experimentos de conducción se confeccionó un modelo de barreras de energía que permite calcular la corriente unitaria del canal en las condiciones experimentales estudiadas. La metodología con que se calcularon los valores de corriente está descrita en la sección 2.5.1.3 de los Métodos y en Alvarez y cols. (1991). Los criterios con que se seleccionaron las características del modelo están descritos en la sección 2.5.1.3.4.

Tal como se muestra en la figura 3.14, el modelo tiene tres barreras y dos pozos de energía, las barreras de acceso y los pozos se encuentran dispuestos simétricamente en torno a la barrera central, los picos de las barreras de acceso se encuentran fuera del campo eléctrico y los pozos se encuentran a una distancia eléctrica de 0,35 de estos picos.

El modelo incorpora la posibilidad de ocupación doble y el efecto de cargas superficiales negativas sobre la conducción. La ocupación sencilla o doble se especifica fijando al parámetro de repulsión electrostática $A_{Na-Na} = 20 kT$ o dejándolo como parámetro ajustable, respectivamente (ver sección 2.5.1.3.1). La ausencia o presencia de un potencial de superficie presente en ambas caras del canal se especifica fijando las densidades, σ_{in} , σ_{ex} en $3,2 \times 10^{-7} e nm^{-2}$ o dejándolas como parámetros ajustables (ver sección 2.5.1.3.2).

Figura 3.14. Modelo de barreras.

Perfil de energía para el paso de los iones a través de el canal. P_1 , P_2 y P_3 son los picos de energía, W_1 y W_2 , corresponden a los pozos. El perfil mostrado (línea continua) corresponde al subestado $gama_1$ para el ión sodio (Tabla 3.1), pues, las diferencias con el subestado $gama_2$ son menores a 0,5 unidades de kT y en el dibujo estas diferencias no son apreciables. La línea discontinua representa el cambio en el perfil de energía para el segundo ion cuando uno de los sitios ya está ocupado, este perfil se calculó de acuerdo a la ecuación 2.6. El modelo de barreras tiene en común para todos los iones que, la altura de los tres picos y la profundidad de los dos valles son idénticas entre sí, las posiciones de los picos y pozos son idénticas para todos los iones.



3.2.6.1 El mejor ajuste de las relaciones conductancia vs. $[Na^+]$ se obtiene con modelos de barreras que incorporan ocupación doble y la presencia de cargas negativas en la superficie del canal.

En la figura 3.12, las líneas que pasan sobre los puntos experimentales representan el mejor ajuste del modelo de conducción iónica de la sección 3.2.6 que consiste de un sistema de tres barreras y dos pozos de energía. Los parámetros finales de ajuste se encuentran en la tabla 3.1. Además, como primera aproximación al ajuste de las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$, se supuso que las densidades de cargas negativas son iguales a ambos lados del canal.

La línea de trazos cortos corresponde al mejor ajuste del modelo de barreras de la figura 3.14 en que el factor de repulsión electrostática entre dos iones se ha fijado en 20 kT (condición que no permite más de un ion en la vía de conducción). Este modelo tiene tres parámetros ajustables: la altura de las barreras, la profundidad de los pozos y la densidad de carga superficial en ambas bocas del canal, las que, en este caso, se suponen idénticas.

La línea discontinua de trazos largos muestra el mejor ajuste del modelo de barreras de la figura 3.14 en que σ se ha dejado fija en $3,2 \cdot 10^{-7} \text{ e} \cdot \text{nm}^{-2}$, valor que genera un potencial de superficie despreciable. Este modelo tiene tres parámetros ajustables: La altura de los picos, la profundidad de los pozos y el factor de repulsión electrostática entre dos iones.

La línea continua corresponde al ajuste de un modelo de barreras que incluye la posibilidad de doble ocupación e incluye carga superficial (esto se consigue dejando libres los cuatro parámetros ajustables)

El modelo que da mejor cuenta de las dos familias de curvas es el modelo que incluye carga superficial y doble ocupación, esto se ve reflejado en los valores las sumas de cuadrados mostrados, para cada modelo, en la tabla 3.1. Para este modelo, las diferencias entre los sistemas de conducción de γ_1 y γ_2 residen fundamentalmente en la altura de los picos (ver tabla 3.1). Si se compara las diferencias entre los picos y entre los valles de γ_1 y γ_2 para el ajuste con carga superficial y ocupación doble, la diferencia entre los picos de energía es 0,49 kT, en cambio las diferencias entre los valles es de 0,14 kT, esto mismo se puede apreciar tanto para el Li^+ , como para el Cs^+ (tabla 3.2).

Tabla 3.1

Parámetros de ajuste de la relación de conductancia vs. $[Na^+]$
con el modelo de barreras

	caso	picos	pozos	A_{Na-Na}	σ	sum. de cuasad.
$gama_1$	carga superf.	12,62	0,52	20,00*	0,200	0,0080
	dos iones	6,83	-6,35	3,49	$3,2 \cdot 10^{-7}$ *	0,0058
	dos iones y c. superf.	8,79	-4,22	2,63	0,026	0,0023
$gama_2$	carga superf.	12,28	-0,16	20,00*	0,142	0,0031
	dos iones	7,16	-6,39	3,05	$3,2 \cdot 10^{-7}$ *	0,0020
	dos iones y c. superf.	9,28	-4,08	2,11	0,029	0,0013
Diferencias entre los parámetros de $gama_1$ y $gama_2$ ($P_1 - P_2$)						
$P_1 - P_2$	carga superf.	0,34	0,68	-	0,081	
	dos iones	-0,33	-0,04	0,44	-	
	dos iones y c. superf.	-0,49	-0,14	0,52	0,002	

Los asteriscos junto a los valores indican que en el ajuste se usaron como parámetros fijos. Los valores de energía de los picos, los pozos y A_{Na-Na} están expresados en unidades de kT (el estado de referencia es 1 molar). Los valores de σ están expresados en $-e/nm^2$ y se suponen iguales a ambos lados del canal. Los valores de la suma de cuadrados están expresados en pA^2 .

3.2.6.2 Ajuste de las relaciones corriente-voltaje

Para ajustar las relaciones corriente voltaje en condiciones simétricas de sodio (figura 3.10), se dejaron fijos los parámetros de energía (barreras, pozos y factor de repulsión electrostática) obtenido de los ajustes de γ_1 y γ_2 de la sección anterior, y se dejaron libres los valores de densidad de carga superficial en ambos lados del canal para estudiar la posibilidad de que las densidades de cargas superficiales sean diferentes a ambos lados del canal. En la figura 3.11 la línea continua sobre las relaciones corriente-voltaje, representa los valores obtenidos del ajuste del modelo de la figura 3.14 con los parámetros de la tabla 3.1. A partir del ajuste de relaciones corriente-voltaje a baja concentración de sodio, como las obtenidas en Na^+ 2 mM, se puede estimar la densidad de carga superficial para cada cara del canal. Los parámetros de las densidades de carga superficial obtenidos para las caras intracelular y extracelular del canal se muestran en la tabla 3.2. Los resultados de este tipo de ajuste muestran que, tanto para γ_1 , como para γ_2 , la densidad de carga superficial es aproximadamente dos veces mayor en el lado externo del canal.

Cuando dos especies iónicas distintas pueden ocupar un canal que permite ocupación doble, es necesario especificar un factor de repulsión electrostática, entre iones de la misma especie y entre iones de especies diferentes.

Por simplicidad, para realizar los ajustes de las relaciones corriente-voltaje de los experimentos en condiciones bilónicas Li/Na de la figura 3.13a, para γ_1 y γ_2 , los factores de repulsión electrostática se dejaron iguales ($A_{\text{Li-Li}} = A_{\text{Li-Na}} = A_{\text{Na-Na}}$). Ellos fueron fijados a los valores de $A_{\text{Na-Na}}$ obtenidos de los ajuste de las relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ para γ_1 y γ_2 . Por lo tanto, en estos ajustes, se dejaron sólo dos parámetros libres, la altura de las barreras y la profundidad de los pozos para el ion litio. Como resultado de estos ajustes, tanto para γ_1 , como para γ_2 , los parámetros de conducción para el Na^+ son los que se muestran en la tabla 3.2. El ajuste de estos resultados, indican que, al igual que para el Na^+ , para el Li^+ , las diferencias entre los parámetros de energía de los sistemas de conducción de γ_1 y γ_2 residen fundamentalmente en la altura de las barreras (tabla 3.2).

Tabla 3.2

Parámetros de ajuste derivados de los valores de la tabla 3.1 y de las relaciones corriente-voltaje en condiciones biiónicas y simétricas de sodio.

	ion	picos	pozos	A_{X-X}	σ_{ex}	σ_{in}	relación I-V
γ_{1}	Li ⁺	9,11	-5,08	2,36*	0,041*	0,023*	Li/Na
	Na ⁺	8,83*	-4,25*	2,36*	0,041*	0,023*	Na/Na
	Cs ⁺	12,44	-1,64	0,64	0,041*	0,023*	Cs/Na
γ_{2}	Li ⁺	9,58	-4,82	2,36*	0,041*	0,023*	Li/Na
	Na ⁺	9,28*	-4,00*	2,36*	0,041	0,023	Na/Na
	Cs ⁺	12,97	-2,10	0,75	0,041*	0,023*	Cs/Na
Diferencias entre los parámetros de γ_{1} y γ_{2} ($P_1 - P_2$)							
$P_1 - P_2$	Li ⁺	-0,47	-0,26	0,00			
	Na ⁺	-0,54	-0,25	0,00			
	Cs ⁺	-0,53	0,46	-0,11			

Los valores de energía de los picos, de los pozos, de A_{Na-X} y de A_{X-X} están expresados en unidades de kT. El estado de referencia es 1 Molar. Los valores de σ_{in} y σ_{ex} corresponden a la densidad de cargas negativas presente en las caras interna y externa del canal, respectivamente, estos valores están expresados en $-e/nm^2$. El valor de $A_{Na-Na} = 2,36$ kT corresponde al promedio geométrico de los valores de A_{Na-Na} de la tabla 3.1, fijando este valor se ajustaron nuevamente las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ para γ_{1} y γ_{2} dando resultados levemente diferentes a los de la tabla 3.1, estos resultados se usaron como parámetros fijos en el ajuste de las relaciones corriente-voltaje. Los ajustes de las relaciones corriente-voltaje se hicieron dejando libres entre cero y cuatro parámetros (los parámetros fijos son indicados por un asterisco). Las relaciones I-V Na/Na corresponden a los resultados mostrados en la figura 3.11, las relaciones Li/Na y Cs/Na corresponden a los resultados mostrados en la figura 3.13.

A diferencia de los experimentos bilínicos Li/Na, en el que todos los parámetros de repulsión electrostática se dejaron fijos e iguales, tanto para gama_1 , como para gama_2 , no fué posible obtener ajustes razonables de las relaciones corriente-voltaje de los experimentos en condiciones bilínicas Cs/Na, a menos que los parámetros de repulsión fueran dejados libres. Por esta razón, en los ajustes de las relaciones corriente-voltaje de la figura 3.13B, se dejaron tres parámetros ajustables, la altura de las barreras y la profundidad de los pozos para el Cs^+ , los factores de repulsión electrostática se dejaron iguales ($A_{\text{Cs-Cs}} = A_{\text{Cs-Na}} = A_{\text{Na-Na}}$), pero ajustables. Los parámetros de conducción para el Na^+ se fijaron en los valores indicados en la tabla 3.2. Al igual que los resultados para los iones litio y sodio, el ajuste de las relaciones corriente-voltaje de los experimentos Cs/Na, indican que, las diferencias entre los parámetros de energía de los sistemas de conducción de gama_1 y gama_2 residen, en el caso del ion cesio, fundamentalmente en la altura de las barreras (tabla 3.2).

3.2.7 Predicciones del modelo de barreras.

Del ajuste de los resultados de la figura 3.13 se desprenden dos afirmaciones que pueden ser usadas como hipótesis de trabajo:

I.- El sistema de conducción del canal permite ocupación múltiple y II.- es afectado por un potencial generado por cargas negativas en la superficie de él.

Para apoyar estas afirmaciones, que resultan del ajuste de las curvas de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$, es necesario hacer experimentos para comprobarlas. En esta sección se describen los experimentos que se hicieron a partir de las dos hipótesis descritas anteriormente.

Las diferencias entre los sistemas de conducción de gama_1 y gama_2 son explicables por un cambio en la altura de las barreras de energía. El mecanismo de transporte de iones en ambos estados de conductancia es el mismo (ocupación doble y cargas superficiales). Bastará entonces demostrar que las hipótesis de trabajo son válidas para uno de los dos estados de conductancia. En lo que sigue, con el objetivo de probar las hipótesis de trabajo I y II, se muestran experimentos realizados con los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de

proteasas.

3.2.7.1 *El bloqueo a bajas concentraciones de Na^+ no es explicado por una simple isoterma de inhibición.*

Si un ion puede entrar al sistema de conducción del canal, pero no puede ser transportado a través de él, entonces este ion impedirá transporte de Na^+ convirtiéndose en un bloqueador. Por otra parte, si en la superficie del canal existen cargas negativas, los cationes se acumularán a la entrada del sistema de conducción. A bajas concentraciones iónicas (a las cuales el potencial de superficie es mayor), la efectividad del bloqueo por un catión no permeable debiera ser mayor que la predicha por una simple isoterma de inhibición (MacKinnon y cols., 1989). Además, el efecto inhibitorio debiera ser muy dependiente de la valencia de los cationes usados (ecuación 2.7).

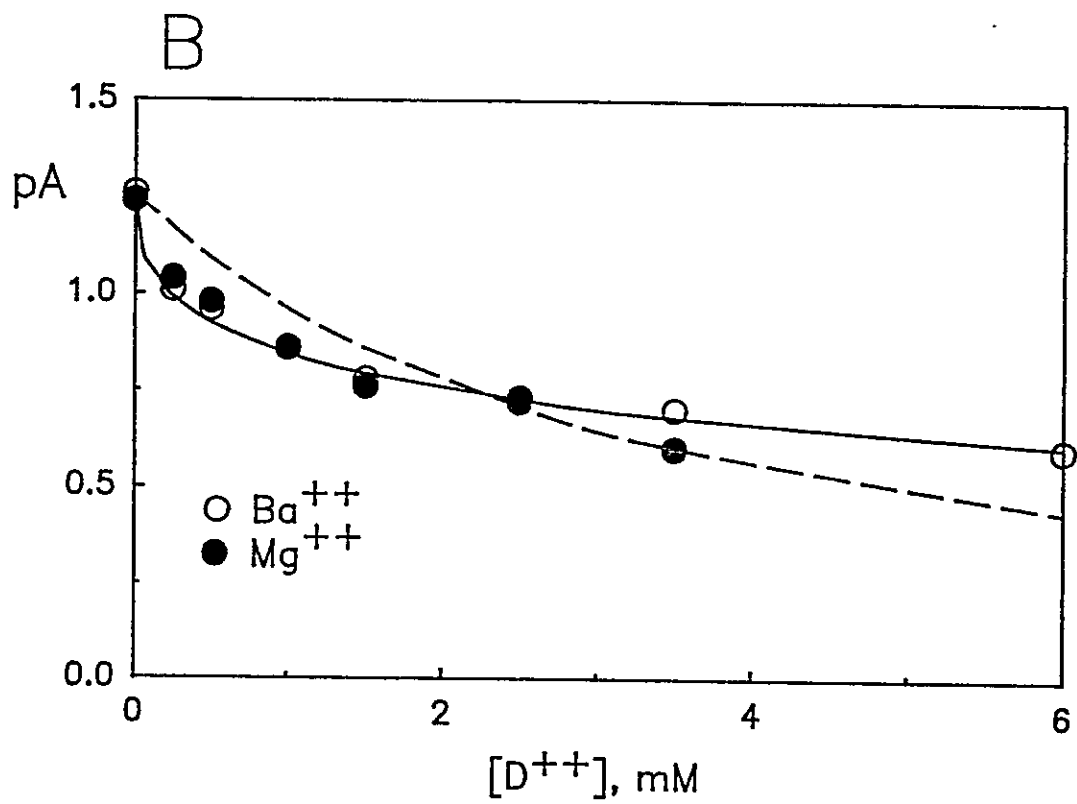
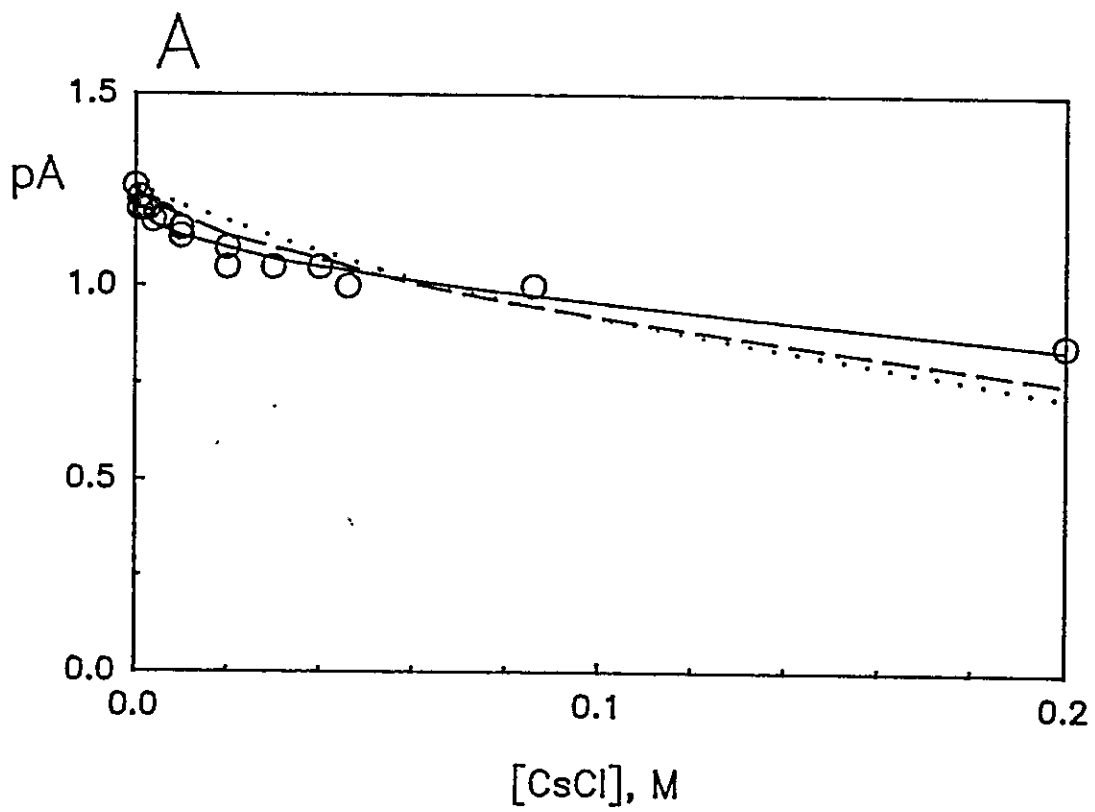
Puesto que de la forma de las relaciones corriente-voltaje a bajas concentraciones de Na^+ se infiere que la densidad de cargas negativas es mayor en el lado externo del canal (sección 3.2.6.2), para estudiar el efecto de cargas de superficie sobre el bloqueo, los experimentos que se describen a continuación se realizaron poniendo el ion bloqueador en el lado externo del canal. Estos experimentos se hicieron en presencia de Na^+ 200 mM en el lado interno, y Mops-NaOH 5 mM en el lado externo.

El Cs^+ es un ion que posee baja afinidad por el canal y es poco permeante (secciones 3.2.4, 3.2.6.2 y tabla 3.2). Entonces, a baja concentración iónica, cuando el potencial de superficie es mayor, el efecto inhibitorio, por acumulación de Cs^+ en la boca externa del canal debiera ser más notorio. La figura 3.15A muestra la corriente a 0 mV como función de la concentración externa de Cs^+ . La línea punteada corresponde al ajuste de mínimos cuadrados de una isoterma de inhibición en que el potencial de superficie, ϕ , es 0, es decir, el canal no presenta cargas negativas en la superficie (ver métodos, sección 2.5.1.4, ecuaciones 2.9 y 2.10), la constante de disociación del proceso de bloqueo, K_D , es 62 mM. La línea discontinua corresponde al ajuste de una isoterma de inhibición alterada por la presencia de un potencial superficial generado por cargas negativas en la cara externa del canal (ecuación 2.9). Para hacer este ajuste, el valor de σ_{ex} era fijado en

Figura 3.15 Bloqueo a bajas concentraciones de sodio.

A.- Inhibición de corrientes por Cs^+ . El gráfico resume dos experimentos con más de cuatro canales en la bicapa, los experimentos se hicieron en 200 mM Na^+ , Mops-NaOH 5mM pH 7 en el lado *cis* de la cámara, y 5 mM Mops-NaOH en el lado *trans*. Para estar seguros de que todos los canales registrados estaban exponiendo el lado externo hacia el lado *trans*, se puso TTX 1 μM en el lado *cis*. La corriente se midió a 0 mV. La línea punteada fue trazada a partir de las ecuaciones 2.9 y 2.10. Los parámetros son: $I_o = 1.26 \text{ pA}$, $\sigma = 0,0 \text{ -e/nm}^2$, $K_D = 62 \text{ mM}$. La línea continua fue trazada con $\sigma = 0,103 \text{ -e/nm}^2$ y $K_D = 733 \text{ mM}$. La línea discontinua fue trazada con $\sigma = 0,041 \text{ -e/nm}^2$ y $K_D = 377 \text{ mM}$.

B.- Inhibición de corrientes por Ba^{++} y Mg^{++} . El gráfico resume un experimento con Ba^{++} y uno con Mg^{++} , en ambos experimentos había más de cuatro canales en la bicapa. Las condiciones iónicas son idénticas a las del panel A, excepto por los cationes divalentes en vez de Cs^+ . Las líneas fueron trazadas con las ecuaciones 2.9 y 2.13. La línea discontinua fue trazada con: $I_o = 1.26 \text{ pA}$, $\sigma = 0,0 \text{ -e/nm}^2$ y $K_D = 3,2 \text{ mM}$. La línea continua fue trazada con $\sigma = 0,041 \text{ -e/nm}^2$ y $K_D = 22 \text{ mM}$.



0,041 e⁻nm⁻² (tabla 3.2) y el valor obtenido de K_D fué 377 mM. La línea continua corresponde al mejor ajuste de la ecuación 2.9 con σ_{ex} y K_D como parámetros ajustables, los valores obtenidos para σ_{ex} y K_D son 0,103 e⁻nm⁻² y 733 mM, respectivamente.

Si los iones en solución se distribuyen de acuerdo a una relación de Boltzmann (métodos, sección 2.5.1.3.2), a un potencial de superficie dado, la concentración de cationes divalentes será e² veces mayor que la concentración de iones monovalentes, por lo tanto, la efectividad del bloqueo por cationes divalentes debiera ser aproximadamente un orden de magnitud mayor que la de los cationes monovalentes.

La figura 3.15B muestra la corriente a 0 mV como función de la concentraciones de Ba⁺⁺ y Mg⁺⁺ en el lado externo. La línea continua fué trazada con la ecuación 2.9, con $\sigma_{ex} = 0,041$ e⁻nm⁻², y $K_D = 22$ mM. Para soluciones compuestas de mezclas de cationes monovalentes y divalentes, la ecuación 2.8 no es aplicable para el calculo de ϕ , por esta razón, el valor ϕ fué aproximado con la expresión 2.13. La línea discontinua corresponde al ajuste de una isoterma de inhibición en que $\phi=0$, el valor obtenido de K_D es 3,2 mM. Estos resultados sirven para ilustrar que el efecto inhibitorio por los cationes divalentes es mayor que con cationes monovalentes, por otra parte, las características del bloqueo por los dos cationes divalentes son similares.

De los resultados de la figura 3.15 queda claro que la inhibición por Cs⁺, Ba⁺⁺ y Mg⁺⁺ no puede ser descrita con una isoterma simple de inhibición y, en cambio, pueden ser adecuadamente descritos cuando se supone la existencia de un potencial de superficie generado por cargas negativas en la superficie externa del canal.

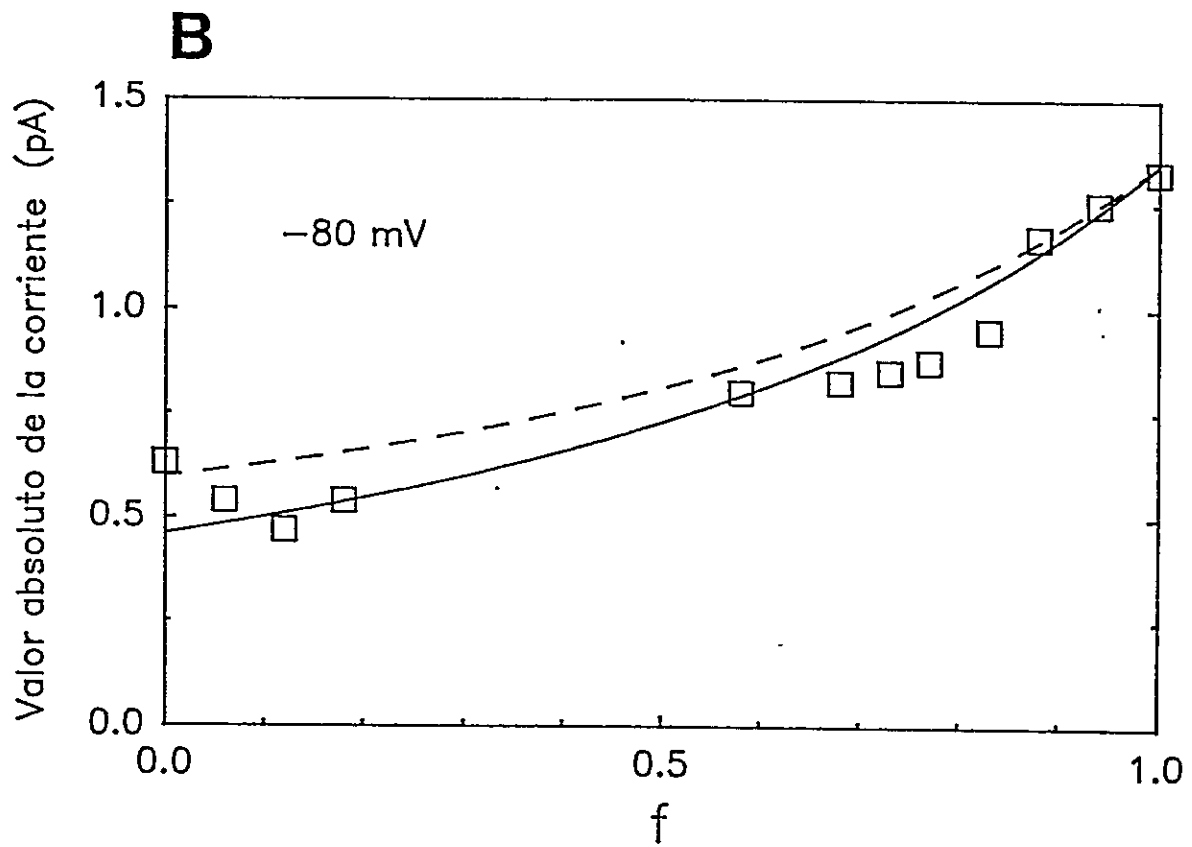
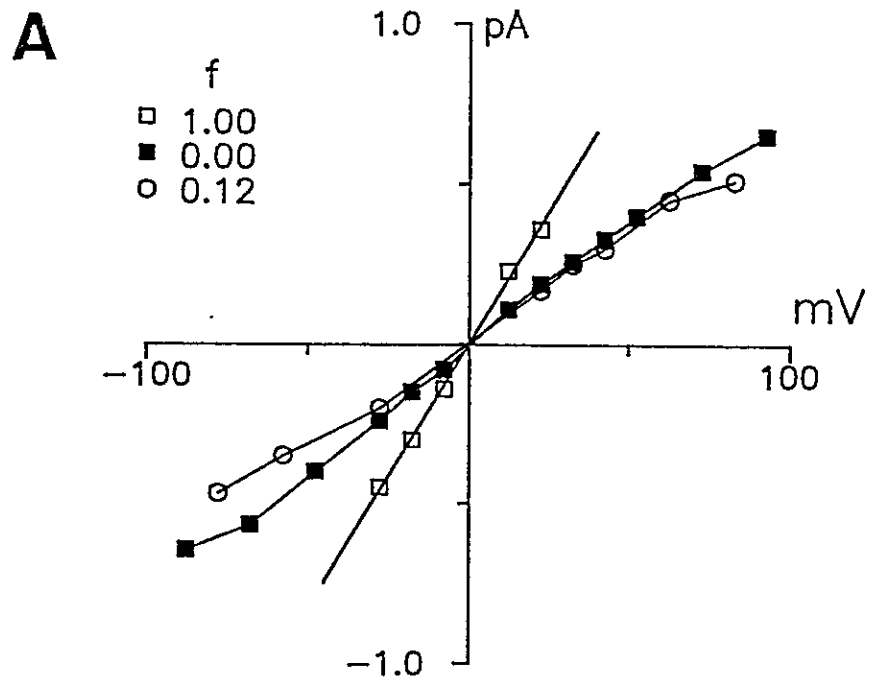
3.2.7.2 El canal de sodio permite ocupación múltiple.

El número de iones que puede ocupar simultáneamente el sistema de conducción de un canal determina el comportamiento de la conductancia del canal cuando esta es medida en mezclas de dos diferentes iones permeantes. Para un canal cuyo sistema de conducción sólo permite un ion, se espera que la conductancia cambie monotónicamente con la fracción molar de las dos especies iónicas permeantes. Sin embargo, si la relación conductancia-fracción molar tiene un máximo o un

Figura 3.16. Efecto anómalo de la fracción molar.

A.- Relaciones corriente-voltaje para el mismo canal a tres valores de f . La concentración de sal fue mantenida constante en 200 mM Mops-XOH 5 mM pH 7. Este experimento se desarrolló incorporando el canal en 200 mM NaCl Mops-NaOH 5 mM pH 7 ($f = 1,0$), luego se perfundieron ambos compartimientos de la cámara con una solución 200 mM LiCl Mops-LiOH 5 mM pH 7 ($f = 0,0$) y dos veces se reemplazó un volumen de 200 μ l de solución 200 mM LiCl Mops-LiOH 5 mM pH 7 por 200 μ l de 200 mM NaCl Mops-NaOH 5 mM pH 7 ($f = 0,12$). Los valores de conductancia en el intervalo ± 30 mV son: 18,1, 10,0 y 9,5 pS a $f = 1,0$, $f = 0,0$ y $f = 0,12$, respectivamente.

B.- Relación entre la corriente medida a -80 mV y la fracción molar f para 4 experimentos. El valor mínimo en la corriente se encuentra en $f = 0,12$ y es de 0,46 pA. La línea continua fue trazada a partir del cálculo de la corriente a -80 mV con el modelo de barreras de la figura 3.14, los parámetros de energía y de densidad de carga superficial usados se encuentran en la tabla 3.2, en este caso $A_{Li-Li} = A_{Na-Na} = 2,36$ kT. La línea discontinua corresponde al cálculo de la corriente con $A_{Na-Na} = 2,36$ kT y $A_{Li-Li} = 1,48$ kT.



mínimo es posible afirmar que el canal puede admitir ocupación múltiple (Hille, 1984; Hess y Tsien, 1984; Eisenmann y cols., 1986; ver sección 1.2.1.2).

Para probar la existencia de ocupación múltiple en el canal de sodio modificado por BTX, se hicieron experimentos de medición de la conductancia a distintas fracciones molares sodio-litio, a concentración iónica constante. En la figura 3.16 se muestran los resultados que resumen estos experimentos. La figura 3.16A muestra relaciones corriente-voltaje para un mismo canal a diferentes fracciones molares Na-Li (f) y a concentración iónica constante (200 mM). Lo más notable de esta figura es que muestra que la corriente (a un potencial dado) en una mezcla de Na-Li ($f=0,12$) es menor que en una solución de 200 mM Li^+ ($f=0$). A potenciales negativos, tal característica es muy notoria, pero, a potenciales positivos, ella no se aprecia claramente. La figura 3.16B se muestra un resumen de varios experimentos a distintas fracciones molares de sodio. En esta figura se grafica la corriente unitaria a -80 mV en función de f . Estos experimentos muestran que el mínimo en la corriente se encuentra en el punto correspondiente a $f=0,12$. Estos resultados no pueden ser explicados por un modelo de conducción que no permite ocupación múltiple.

En la figura 3.16B, la línea continua corresponde a la predicción del modelo de barreras cuando se usa el factor de repulsión electrostática $A_{\text{Li-Li}}$ que se ocupó para el ajuste de la relación corriente-voltaje en condiciones biiónicas Na/Li ($A_{\text{Li-Li}} = A_{\text{Na-Na}} = 2,36 \text{ kT}$). La línea discontinua corresponde a la predicción del modelo de barreras cuando el factor $A_{\text{Li-Li}}$ es el obtenido a partir del ajuste de la relación corriente-voltaje en 160 mM Li^+ ($A_{\text{Li-Li}} = 1,48 \text{ kT}$). En estos dos casos se aprecia claramente el modelo de barreras falla en predecir la existencia de un mínimo en la relación de conductancia vs. f .

3.3 Características cinéticas del canal de sodio modificado por BTX.

Uno de los objetivos de este estudio fue determinar la existencia de cargas fijas que generen un potencial de superficie que afecte el comportamiento cinético del canal, para esto, se estudió el efecto de los cambios de concentración de sodio sobre las constantes cinéticas del proceso de apertura y cierre. Por otra parte, para determinar el efecto de la BTX y de los cambios en la concentración de sodio sobre la cinética del canal, es necesario establecer un modelo que explique el comportamiento cinético del canal modificado por BTX. Así, otro de los objetivos de este estudio es probar si el comportamiento cinético de los canales modificados puede ser explicado con modelos lineales, como el del esquema 1.7, o cíclicos como el propuesto por Tanguy y Yeh (1988; esquema 1.8, introducción, sección 1.3.4).

En las secciones 3.3.2 a 3.3.4 se describe el efecto del voltaje y de la concentración de sodio sobre la cinética de apertura y cierre del canal de sodio modificado por BTX. En las secciones 3.3.5 a 3.3.8 se describen los pasos que se dieron para construir un modelo cinético del canal de sodio modificado por BTX. En estos estudios, los experimentos fueron hechos con los canales de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas, ($gama_1$) pues, dada la mayor conductancia de estos canales, la resolución de las corrientes es mejor que con los canales de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas ($gama_2$). En la última sección (3.3.9) se muestra una comparación, en términos cinéticos, entre los canales provenientes de ambas preparaciones ($gama_1$ y $gama_2$).

3.3.1 Examen de estabilidad de los registros.

Las proteínas sufren cambios conformacionales cuyas duraciones promedio van desde los picosegundos hasta las horas (Leibovitch y cols., 1987). El estudio cinético de un canal iónico está limitado a la fracción de esos cambios conformacionales que son relevantes para las transiciones abierto-cerrado y que, además, suceden dentro del intervalo de tiempo que queda delimitado por, la resolución temporal del sistema de registro y por la duración del experimento. Sin embargo, en muchos canales registrados, tanto en células como en bicapas, se han observado cambios

repentinos en el comportamiento cinético del canal (cambios de marcha). Estos fenómenos se han descrito, por ejemplo, en el receptor de glutamato (Gration y cols., 1981) en el canal de potasio activado por calcio (Moczydlowski y Latorre, 1983b; Methfessel y Boehm, 1982), en el canal de sodio modificado por BTX del músculo de rata (Moczydlowski y cols., 1984a) y en canal de calcio tipo L de corazón (Hess y cols., 1984). Estos cambios generalmente consisten en desplazamientos en el tiempo de la probabilidad de encontrar el canal abierto, es decir el comportamiento cinético de los canales no se muestra estacionario. En comparación con la cinética de apertura y cierre, la frecuencia con que estos fenómenos ocurren durante el registro de canales es muy baja, y por lo tanto, no es posible estudiarlas sistemáticamente. Por esta razón, en esta tesis, el estudio de las características cinéticas del canal se limitó a aquellos registros que durante el intervalo de tiempo que duró el registro actividad no mostraron cambios de marcha.

Para medir la estabilidad de los registros de corriente, se examinó la variación de P_o como función del tiempo. Esto se hizo tomando intervalos consecutivos de un segundo cada uno, y se midió P_o dentro de cada intervalo. En la figura 3.17A se muestra la historia de fluctuaciones de P_o de un canal en función del tiempo a tres voltajes distintos, -120, -112 y -97 mV, representados por círculos negros, círculos blancos y triángulos negros, respectivamente, la línea continua que pasa por cada grupo de puntos corresponde al valor promedio de P_o durante el registro. De acuerdo a los resultados ilustrados en la figura 3.4 se observa que los valores de P_o son mayores a potenciales menos negativos. Además, se observa que las fluctuaciones del valor de P_o son menores cuando el valor promedio de P_o es cercano a 1 o 0 (por ejemplo, -97 y -120, respectivamente). A falta de un criterio estadístico para evaluar si los cambios de P_o con el tiempo que se muestran en la figura 3.17A son posibles dentro de un régimen estacionario, se construyeron registros simulados con el modelo II (sección 2.5.2.5) para cada potencial y se les sometió al análisis de estabilidad. Las constantes cinéticas usadas para estas simulaciones son tomadas, para cada potencial, de los resultados que se muestran en la figura 3.28A. El resultado del análisis de los registros simulados se muestran en la figura 3.17B, en ellos se aprecia que, las oscilaciones en el valor de P_o son menores cuando el valor promedio de P_o es cercano a 1 o 0. así

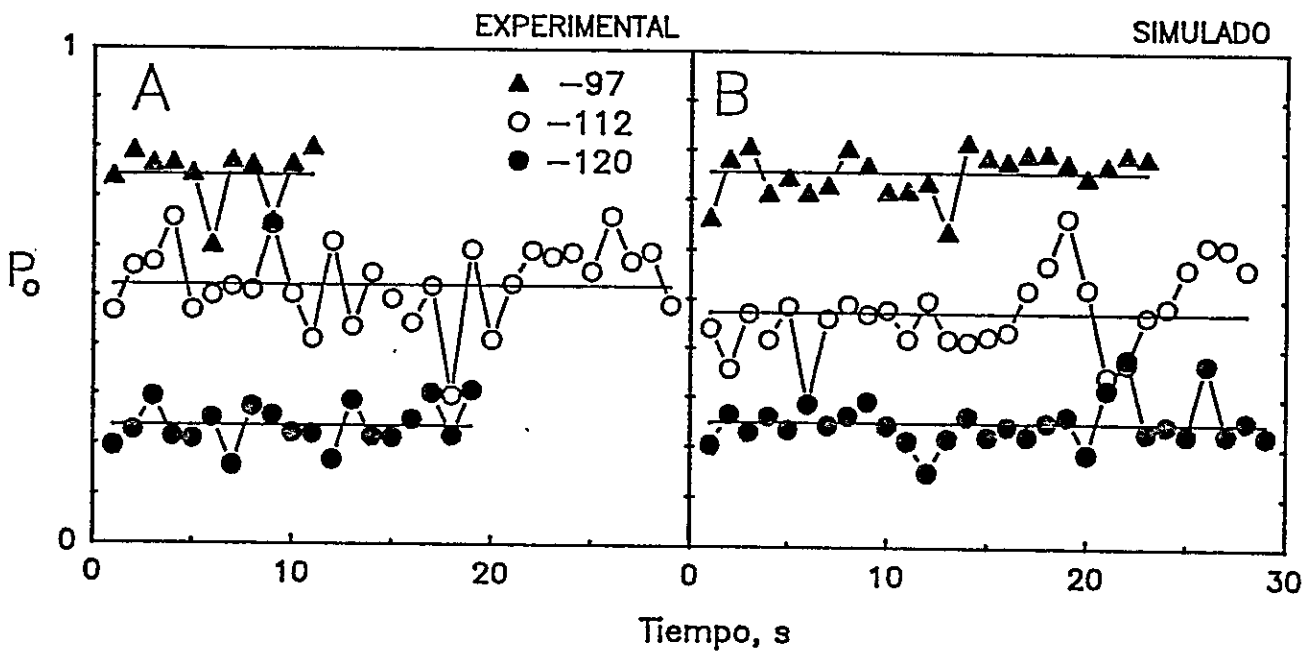


Figura 3.17. Examen de estabilidad de P_o en función del tiempo.

En ambos paneles, los círculos negros, círculos blancos y triángulos negros representan -120, 112 y -97 mV, respectivamente. Para el cálculo de los valores de P_o en el tiempo, el registro de corriente se divide en sectores de un segundo, se calcula la fracción del tiempo en que el canal está abierto. Todos aquellos sectores en que se detectaron eventos cerrados de duración mayor que 200 ms no fueron graficados. La línea continua sobre cada población de valores corresponde al promedio de P_o a cada voltaje sobre todo el registro de corriente

A.- Examen de estabilidad de los registros de corriente de un canal a tres potenciales diferentes. Los valores de P_o a -120, -112 y -97 mV son 0,24, 0,52 y 0,74. Las duraciones de cada registro de P_o corresponde a la duración del registros de corriente a cada voltaje.

B.- Examen de estabilidad de un registro simulado con el modelo II a tres voltajes diferentes. Las constantes cinéticas usadas para simular los registros fueron tomadas de los valores graficados en la figura 3.32. Para los voltajes -120, 112 y -97 mV se usaron las constantes determinadas a partir del ajuste de las distribuciones de la figura 3.28A. Los valores promedio de P_o a -120, -112 y -97 mV son 0,25, 0,47 y 0,75.

mismo, la amplitud de las oscilaciones, a cada potencial, es similar a la de los registros experimentales. Por estas razones, a partir de resultados como los de la figura 3.17 se puede concluir que las oscilaciones de P_o observadas experimentalmente son posibles dentro de un régimen estacionario.

En esta parte del trabajo, de cinco experimentos en que se estudió el efecto del potencial en Na^+ 200 mM a ambos lados del canal, en tres de ellos los registros de P_o en función del tiempo a cada voltaje no fueron considerados estables en el tiempo. Los tres experimentos hechos en NaCl 3 M fueron considerados estables. Puesto que el análisis cinético que se desarrolla a continuación no es aplicable a registros que no son estacionarios (Colquhoun y Sigworth, 1983; Blatz y Magleby, 1986b), el análisis detallado del efecto del voltaje que se desarrolla a continuación, se realizó a partir de los dos experimentos estables en Na^+ 200 mM y de los tres experimentos en Na^+ 3 M.

3.3.2 La cinética de los canales de sodio depende de la concentración de sodio.

En el axón de calamar, el aumento hasta 50 mM en la concentración de cationes divalentes en el medio externo desplaza la curva de activación entre +8 y +15 mV (Frankenhauser y Hodgkin, 1957; Gilly y Armstrong, 1982). En el músculo esquelético de rana, el aumento de la concentración externa de calcio desde 2 a 40 mM desplaza la curva de activación en +30 mV (Hahn y Campbell, 1983). Resultados similares a estos se han encontrado en canales tratados con BTX incorporados a bicapas (Cukierman y cols., 1988; Behrens y cols., 1989). Para explicar el efecto de los cationes divalentes sobre la cinética de los canales de sodio, Frankenhauser y Hodgkin (1957) propusieron que en la superficie externa del canal existen cargas negativas que generan un potencial de superficie, así, la diferencia de potencial eléctrico que siente el sistema de compuertas del canal corresponde a la suma del potencial superficial y el potencial aplicado. En consecuencia, el efecto de los cationes divalentes sobre la cinética del canal consiste en reducir el potencial de superficie (MacLaughlin, 1989; Latorre y cols., 1991) y por lo tanto modifican el campo eléctrico que gobierna al mecanismo de compuertas del canal.

Si el efecto de los cationes divalentes sobre la cinética del canal se debe a la modificación del potencial de superficie, entonces, todos los parámetros que describen el comportamiento cinético del canal deben desplazarse de la misma manera en el eje del potencial. El resultado más concluyente que muestra la presencia de un potencial de superficie que modula la cinética de los canales de sodio ha sido obtenido por Hahn y Campbell (1983) en los canales de Na^+ de músculo esquelético de rana. Estos autores observaron que, tanto la cinética de activación, como la de inactivación de las corrientes macroscópicas y de desplazamiento de cargas de compuerta ("gating currents") se desplazan en el eje del voltaje en la misma magnitud que la curva de activación (+30 mV) cuando la concentración externa de Ca^{++} es elevada de 2 a 40 mM. Sin embargo, en este trabajo no se clarifica si el potencial de superficie es originado por cargas presentes en el canal o en los lípidos de la membrana del músculo.

Para estudiar el efecto del potencial de superficie sobre la cinética del canal de sodio modificado por BTX, y para determinar si las cargas que generan el potencial de superficie se encuentran en la proteína-canal o la membrana, en esta tesis se estudió el efecto de elevar la concentración iónica en ambos lados del canal. Este estudio se hizo modificando las concentraciones interna y externa de Na^+ , pues, los cationes divalentes como el Ca^{++} o Zn^{++} reducen notablemente la conductancia del canal (Cukierman y cols., 1988; Behrens y cols., 1989), y por lo tanto, deterioran la resolución temporal del registro de corriente. Por otra parte, puesto que las bicapas de fosfatidiletanolamina en que los canales fueron incorporados son neutras a pH 7 (McLaughlin y cols., 1971), cualquier desplazamiento de la curva de activación en el eje del potencial como resultado de la modificación de la fuerza iónica del medio sólo puede ser atribuido a cargas presentes en la superficie del canal y no en los lípidos.

3.3.2.1 *Al bajar la concentración de sodio en el lado interno del canal la curva de activación se desplaza a potenciales menos negativos.*

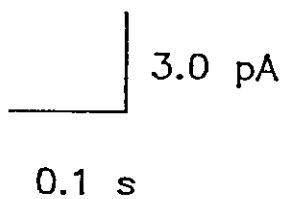
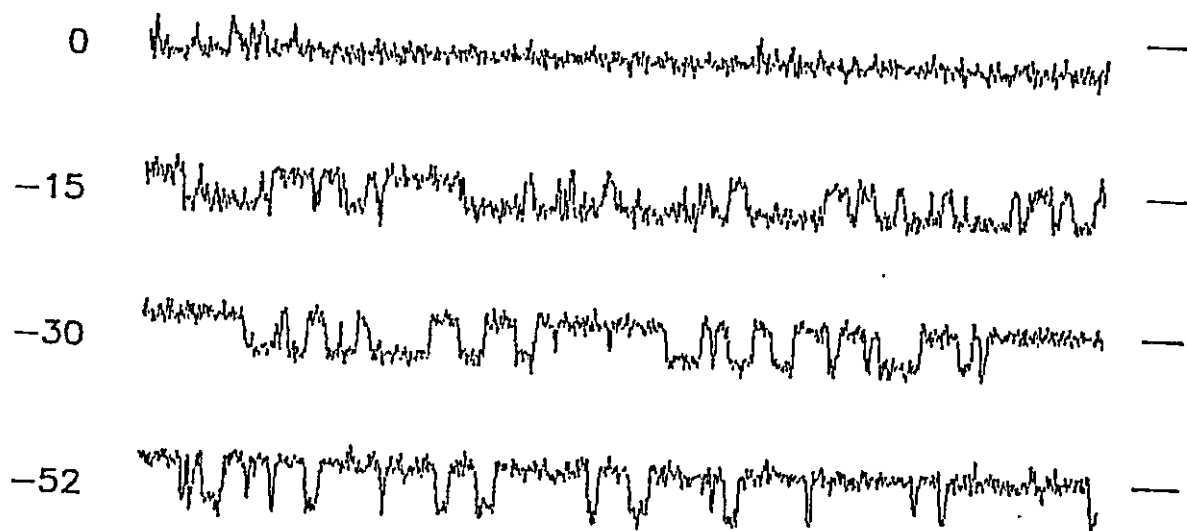
Si en la superficie del canal existen cargas negativas, al cambiar la concentración iónica en alguno de los lados del canal, se producirá una diferencia de potencial entre los dos extremos del

Figura 3.18. Efecto de bajar la concentración de sodio en el lado interno del canal.

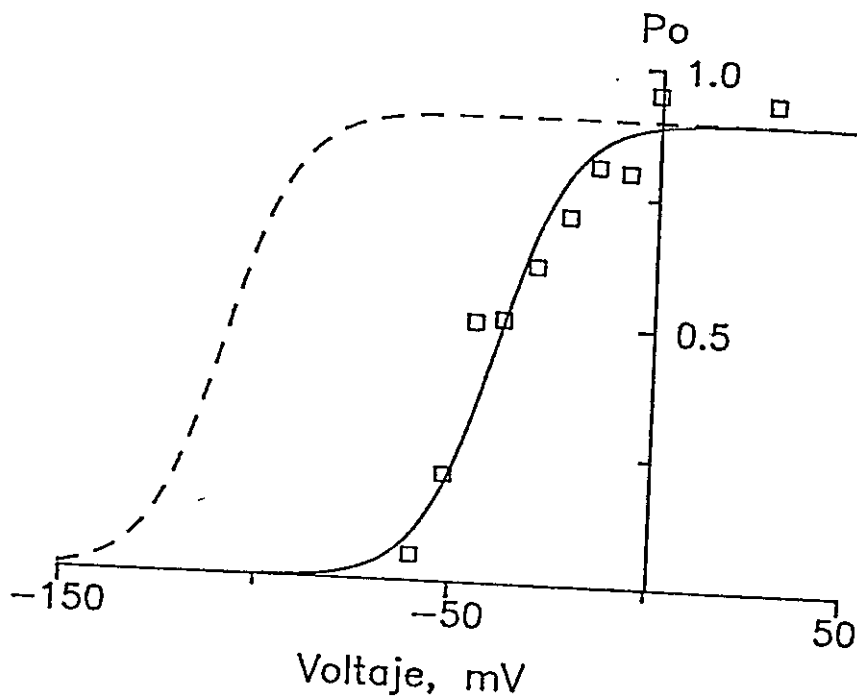
A.- Registros de corriente de un canal en presencia de Na^+ 200 mM en el lado externo y Mops-NaOH 5 mM pH 7 en el lado interno. Los números al costado izquierdo de los registros corresponde al potencial aplicado en mV. La línea horizontal al extremo derecho de cada registro indica el nivel de corriente correspondiente al canal cerrado. [BTX] = 100 nM. Filtro 300 Hz (-3 dB).

B.- P_o vs. voltaje. Los valores de P_o se calcularon excluyendo todos los eventos cerrados con duración superior a 200 ms. La línea continua fue trazada a partir de la ecuación 3.1 con los valores de V_o , n y P_{\max} iguales a -39 mV, 2,8 y 0,92, respectivamente. La línea discontinua corresponde al ajuste de la curva de activación de los experimentos hechos con los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas en Na^+ 200 mM en ambos lados del canal (figura 3.4).

A



B



canal que se sumará a la diferencia de potencial aplicada. En la figura 3.18A se muestran registros de un canal a diferentes voltajes. Estos experimentos se hicieron en 200 mM de sodio en el lado extracelular del canal y Mops-NaOH 5 mM en el lado intracelular. La línea horizontal al costado derecho de los registros indica el nivel de corriente del canal cerrado, los valores del voltaje aplicado están indicados en el extremo izquierdo cada registro. Si se compara esta figura con la figura 3.4 se puede apreciar que, el intervalo de voltajes al cual se produce la mayor variación en P_o se encuentra a potenciales negativos considerablemente menores que cuando la concentración de sodio es 200 mM en ambos lados del canal. Esto se aprecia mejor en la figura 3.18B en que se grafica P_o en función del voltaje en las condiciones iónicas mencionadas previamente. La línea continua representa el ajuste de la ecuación 3.1 a los valores graficados. Los parámetros de ajuste para esta curva fueron $V_o = 39,0$ mV y $n = 2,0$. Para dos experimentos como este, los promedios de V_o y n fueron de $-47,0 \pm 11,3$ y $2,8 \pm 1,1$, respectivamente.

Comparados con los resultados obtenidos en Na^+ 200 mM mostrados en la figura 3.4, estos resultados indican que la curva de activación de los canales se ha desplazado $\approx +60$ mV. Ellos pueden ser explicados suponiendo que, al menos en la cara interna del canal existen cargas negativas que generan un potencial de superficie y, que a 5 mM Mops-Na en el lado interno y 200 mM de sodio en el lado externo, la diferencia entre los potenciales de superficies de las caras interna y externa del canal es ≈ -60 mV. Por esta razón cuando el potencial aplicado es de -40 mV, el sistema de compuertas del canal siente un potencial que en 200 mM en ambos lados del canal simétrico de sodio es equivalente a -100 mV.

3.3.2.2 Al aumentar la concentración de sodio en ambos lados del canal la curva de activación se desplaza hacia potenciales menos negativos.

Si las dos caras del canal estuvieran igualmente cargadas, entonces, al cambiar simétricamente la concentración iónica en ambos lados del canal, no se espera un corrimiento de la curva de activación en el eje del voltaje, pues, el efecto de encubrimiento de cargas por los contraiones debería ser el mismo para ambas caras del canal. Por otra parte, si la densidad de

cargas superficiales es diferente en las dos caras del canal, al cambiar la concentración iónica en la misma cantidad en ambas caras del canal, la curva de activación se desplazará en el eje del voltaje (Cukierman y cols., 1988), pues, el efecto de encubrimiento de cargas será mayor en la cara más cargada, y por lo tanto, el potencial de superficie será más afectado donde hay mayor densidad de cargas (Latorre y cols., 1991). Por ejemplo, si la densidad de cargas negativas es mayor en la cara externa del canal, al aumentar la concentración iónica, la curva se desplazará hacia potenciales positivos, pues, la reducción en el potencial de superficie (que es negativo) será mayor en el lado externo, y esto es equivalente a hiperpolarizar al canal.

La figura 3.19A muestra varios registros del mismo canal en Na^+ 3 M en ambos lados del canal a distintos potenciales. En esta figura, la línea horizontal a la derecha de cada registro indica el nivel de corriente correspondiente al canal cerrado. El potencial aplicado está indicado a la izquierda de los registros. En ellos se aprecia que la fracción del tiempo en que el canal se encuentra abierto depende del potencial aplicado. Al comparar estos registros con los de la figura 3.1 y 3.2 se aprecia que a potenciales equivalentes, en 3M sodio, la probabilidad de encontrar el canal abierto es menor, por ejemplo; en el registro de la figura 3.2B a -90 mV, el canal se encuentra la mayor parte del tiempo en el estado abierto, en cambio, en el registro de esta figura a 3.19A el canal se encuentra prácticamente todo el tiempo cerrado.

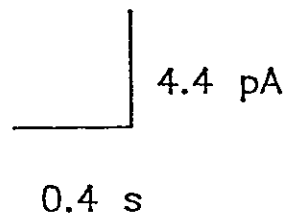
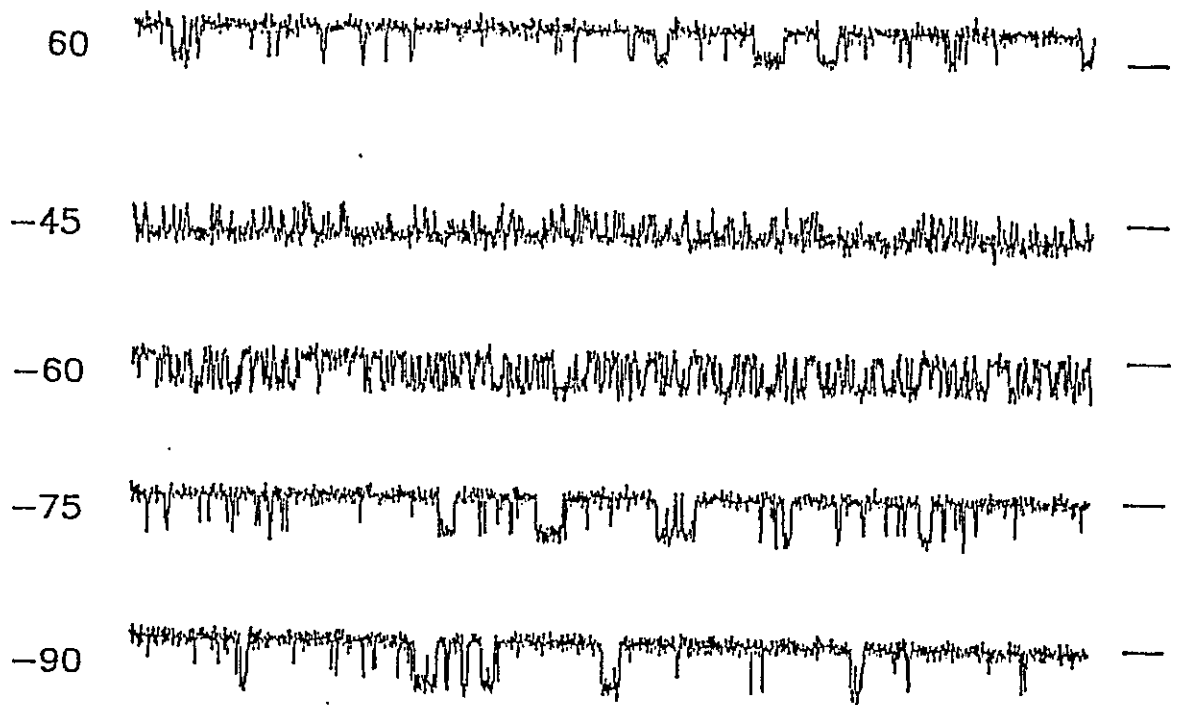
En la figura 3.19B se muestran las curvas de activación de siete experimentos echos a tres diferentes concentraciones de sodio, 0,5 (n=2), 1,0 (n=2) y 3,0 (n=3) M NaCl (representados con cuadrados blancos, círculos blancos y estrellas, respectivamente). Las líneas continuas sobre los valores experimentales corresponden al ajuste de la ecuación 3.1. La línea discontinua corresponde al ajuste de la curva de activación de los experimentos hechos con los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas en Na^+ 200 mM en ambos lados del canal. Es interesante notar que las curvas de activación de todos los experimentos caen en la misma región del gráfico, y la dispersión en los valores de P_o es notoriamente menor que en Na^+ 200 mM en ambos lados del canal, por esta razón, a todos los resultados se les ajustó la ecuación 3.1 usando, los valores promedios de n y V_o calculados, y de

Figura 3.19. Efecto de subir la concentración de sodio en ambos lados del canal.

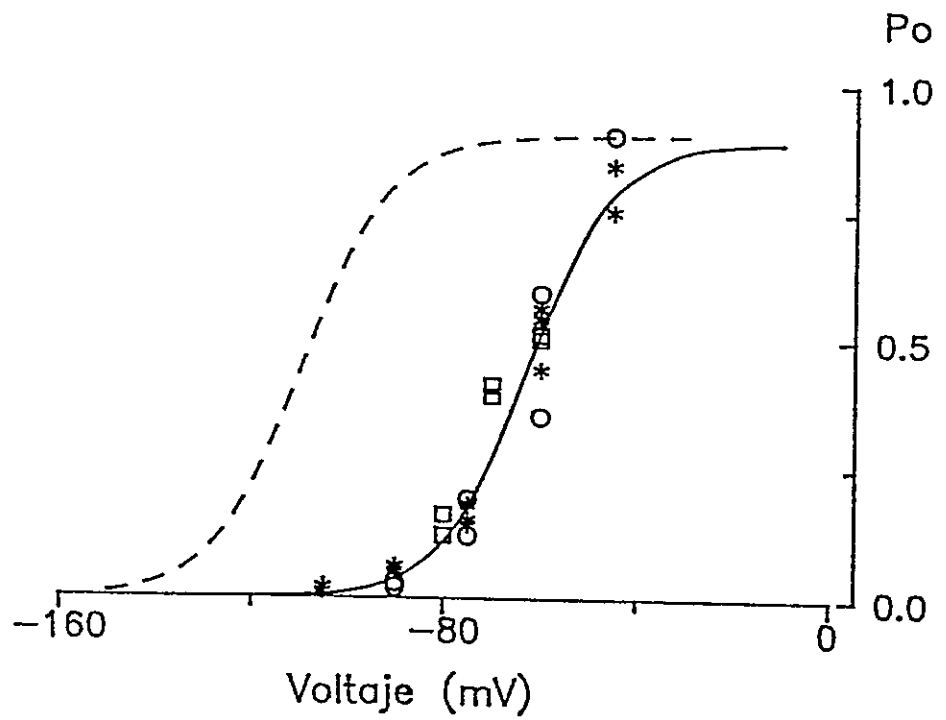
A.- Registros de corriente de un canal en presencia de Na^+ 3,0 M en ambos lados del canal. Los números al costado izquierdo de los registros corresponde al potencial aplicado en mV. La línea horizontal al extremo derecho de cada registro indica el nivel de corriente correspondiente al canal cerrado. [BTX] = 100 nM. Filtro 300 Hz (-3 dB).

B.- P_o vs. voltaje. Esta figura representa el resumen de siete experimentos en altas concentraciones de sodio a ambos lados del canal: 0,5, 1,0 y 3,0 M, representados por cuadrados blancos, círculos blancos y asteriscos, respectivamente. Los valores de P_o se calcularon excluyendo todos los eventos cerrados con duración superior a 200 ms. La línea continua corresponde al mejor ajuste de la ecuación 3.1, los valores de V_o , n y P_{max} son -62,6 mV, 2,91 y 0,90, respectivamente. La línea discontinua corresponde al ajuste de la curva de activación de los experimentos hechos con los canales provenientes de la preparación hecha en presencia de inhibidores de proteasas en Na^+ 200 mM en ambos lados del canal (figura 3.4).

A



B



P_{\max} medidos, de todos los experimentos. Estos valores son: $n=2,91 \pm 0,66$ ($n=7$), $V_0 = 62,6 \pm 3,0$ mV ($n=7$) y $P_{\max} = 0,90 \pm 0,05$.

Con respecto al valor de V_0 de los experimentos hechos en NaCl 200 mM en ambos lados del canal ($V_0=-110$ mV), el desplazamiento en $\approx +50$ mV en el eje del voltaje, indica que la densidad de cargas negativas es mayor en la superficie externa que en la interna del canal. Por otra parte, dado que las curvas de activación en 1,0 y 3,0 M están en la misma región del potencial, es posible proponer que a partir de 1 M la diferencia entre los potenciales de superficie en ambos lados del canal es despreciable.

3.3.3 Distribuciones de tiempos de permanencia.

Para interpretar el efecto del voltaje sobre la cinética del canal, es necesario analizar las distribuciones de los tiempos de permanencia, pues, el número de componentes exponenciales de las distribuciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado, especifica el número mínimo de estados abiertos y cerrados del esquema cinético que explique el efecto del voltaje y de la concentración de Na^+ sobre el comportamiento cinético del canal (Colquhoun y Hawkes, 1981; 1983).

3.3.3.1 *Los canales de sodio modificados por BTX poseen a lo menos dos estados cinéticos abiertos.*

En la figura 3.20 se muestran distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado abierto de un canal en Na^+ 200 mM, a cuatro potenciales aplicados diferentes. Los histogramas de duraciones se construyeron dividiendo el eje del tiempo en intervalos que crecen exponencialmente (ver sección 2.5.2.1). La ordenada está representada con una coordenada que corresponde a la raíz cuadrada de el número de eventos en cada intervalo. En este tipo de representación, cuando una distribución está formada por un solo componente exponencial, la posición en el eje del tiempo del máximo de la distribución coincide con el tiempo promedio de la distribución, por esta razón, si la distribución de tiempos de permanencia contiene dos o más

componentes, es posible esperar uno o más máximos en la distribución (Sigworth y Sine, 1987).

A pesar de que en todas las distribuciones de tiempos de permanencia en el estado abierto se observa un solo máximo, la forma de ellas se aparta de lo que se espera de la distribución de un solo componente exponencial. Por esta razón fue necesario ajustar las distribuciones con una expresión de la ecuación 2.16 que corresponde a la suma de dos componentes exponenciales. En la figura 3.20, la línea continua corresponde al ajuste de máxima verosimilitud de la función 2.16 evaluada sobre las distribuciones. Las líneas discontinuas, representan la participación de cada uno de los dos componentes exponenciales en la distribución. Los valores de los parámetros de ajuste de todas las distribuciones están en la leyenda de la figura.

Para todos los voltajes (indicados, en mV, en el extremo superior derecho de cada cuadro), los valores de la verosimilitud de los ajustes de la función 2.16 con dos componentes exponenciales fueron significativamente mejores que los valores de verosimilitud de los ajustes con un solo componente. Por ejemplo, en la distribución en que se presenta una mayor superposición los dos componentes exponenciales (-97 mV), los valores del logaritmo de las verosimilitudes, $L(\theta)$, para el ajuste con uno y dos componentes son 2611,74 y 2600,07, respectivamente, el valor de Chi cuadrado evaluado sobre la diferencia en los valores de $L(\theta)$ es 23,34 ($P \ll 0,005$, ver métodos sección 2.5.2.2). Por lo tanto, el ajuste de esta distribución con dos componentes exponenciales es significativamente mejor que con una exponencial. Operando de la misma manera sobre la distribución a -120 mV (que muestra la mayor separación entre los dos componentes), el valor de Chi cuadrado para las diferencias entre los valores de $L(\theta)$ para uno y dos componentes exponenciales es 143,75 ($P \ll 0,005$). A los componentes de mayor y menor duración les llamaremos O_1 y O_2 , respectivamente (*).

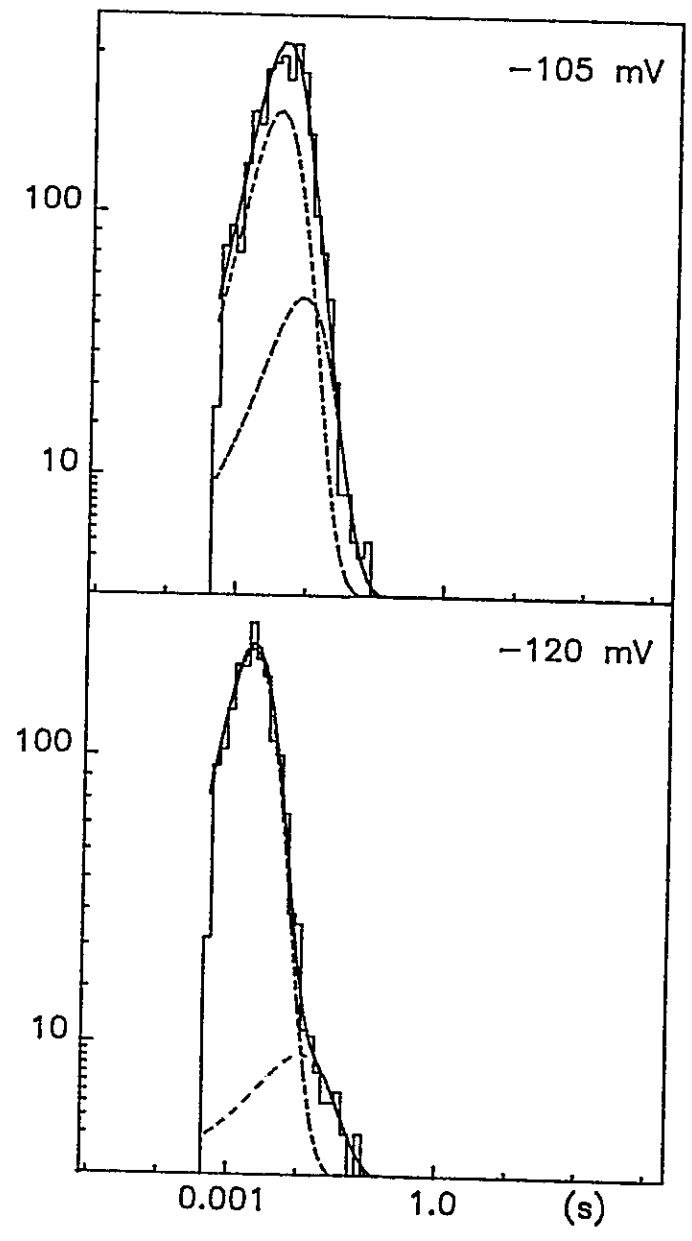
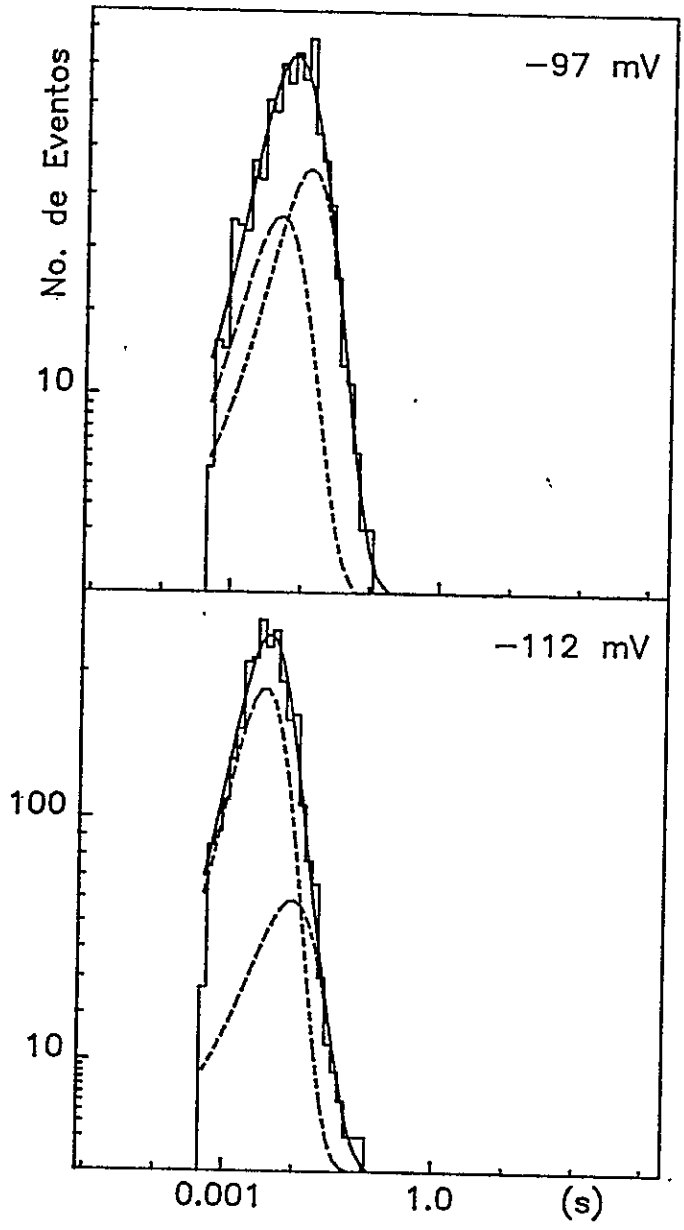
(*) En este experimento, a -112 mV el ajuste con tres exponenciales es significativamente mejor que con dos exponenciales (Chi cuadrado > 5,99; $p < 0,05$). Pero en tal ajuste, el tercer componente (26 ms) tiene un área de 0,011, lo que en este experimento corresponde sólo a 30 eventos, indicando que, si bien, el canal puede tener más de dos estados abiertos, el tercer componente no se expresa a todos los voltajes y además representa una fracción ínfima de todos los eventos.

Figura 3.20 Distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado abierto.

Las distribuciones fueron construidas dividiendo el eje del tiempo en intervalos que crecen exponencialmente (métodos, sección 2.5.2.1). La ordenada representa la raíz cuadrada de la amplitud. La línea continua sobre las distribuciones corresponde a el ajuste de máxima verosimilitud de la ecuación 2.16 con dos componentes exponenciales (métodos, sección 2.5.2.2). Las líneas discontinuas corresponden a la participación de cada uno de los dos componentes exponenciales en cada distribución. Los potenciales aplicados están indicados en el extremo superior derecho de cada cuadro. Los parámetros de ajuste y el número de eventos de cada distribución son los siguientes:

mV	No. de Eventos	τ_{o1} , ms (A_1)	τ_{o2} , ms
-97	893	14,21 (0,66)	5,39
-105	2303	9,61 (0,28)	4,25
-112	2554	10,46 (0,24)	4,03
-120	1511	12,81 (0,05)	2,30.

Notese que en la base las cuatro distribuciones tiene el mismo ancho.



En un registro de canales, cuando la mayoría de los eventos no son detectados por el umbral de detección, las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado exhiben más componentes cinéticos que los que se esperan teóricamente (Colquhoun y Sigworth, 1983; Roux y Sauvé, 1985). Si bien, no es posible descartar la posibilidad de que uno de los dos componentes de las distribuciones sea consecuencia de un número importante de eventos perdidos, en el caso de este trabajo, las constantes de tiempo de los componentes adicionales, producidas por los eventos perdidos, debieran ser menores que 1,2 milisegundos (el 'tiempo muerto' del sistema de registro es 0,6 ms). Todas las constantes de tiempo que se muestran en este trabajo son mayores que 1,2 ms.

Los valores de las dos constantes de tiempo de las distribuciones son muy cercanos. Por ejemplo, la distribución de los tiempos de permanencia en el estado abierto a -112 mV tiene una constante de tiempo que es apenas 2,5 veces mayor que la otra ($\tau_{o1} = 10,46$ ms ($A_1 = 0,24$); $\tau_{o2} = 4,03$ ms ($A_2 = 0,76$). Para verificar que, con el número de eventos detectados a este potencial (2500 eventos), es posible distinguir adecuadamente los dos componentes, se simuló registros en los que las duraciones de los abiertos se distribuyen teóricamente de acuerdo a las constantes de tiempo a -112 mV (ver métodos, sección 2.5.2.5). Se generaron 9 pares de registros de 2500 y 1000 eventos, se hicieron las distribuciones y se ajustaron con el método de máxima verosimilitud (sección 2.5.2.2). Los resultados de los ajustes de estas distribuciones están en la tabla 3.3. En esta tabla queda claro que, aún con 1000 eventos, es posible reconocer los dos componentes exponenciales de las distribuciones, además, la convergencia a los valores teóricos es razonablemente buena, esto se ve en que los valores extremos obtenidos (indicados por * para el máximo y l para el mínimo) no se diferencian en más de un 20% de los valores teóricos. Sin embargo, en la estimación de las áreas, parece haber más dispersión, pues, aún con 2500 eventos la estimación de A_1 oscila entre 0,16 y 0,41. Esto indica que, cambios pequeños en la estimación de la constante de tiempo de un componente, produce grandes cambios en la estimación del área de ese componente.

Tabla 3.3

Parámetros obtenidos del ajuste de registros simulados

Parámetros originales del estado abierto del registro simulado:

τ_{o1} : 10,45 ms
 τ_{o2} : 4,03 ms
 A_1 : 0,24

Simulación #	1000 eventos			2500 eventos		
	τ_{o1}	τ_{o2}	A_1	τ_{o1}	τ_{o2}	A_1
1	10,63	3,99	0,22	11,31	4,18	0,20
2	11,65	4,30	0,22	11,79(*)	4,40(*)	0,16(l)
3	10,71	4,18	0,18(l)	9,80	3,92	0,27
4	10,12	4,41	0,18	10,49	3,79	0,28
5	9,19	3,48	0,36	10,29	3,74	0,30
6	10,95	4,44(*)	0,19	11,28	4,05	0,20
7	12,01(*)	3,99	0,19	10,51	3,94	0,25
8	11,09	3,87	0,23	10,45	3,72	0,28
9	8,73(l)	3,44(l)	0,44(*)	8,81(l)	3,39(l)	0,41(*)

Los símbolos (*) y (l) indican los valores mayores y menores obtenidos de todos los ajustes en cada categoría, respectivamente.

3.3.3.2 Los canales de sodio modificados por BTX poseen a lo menos tres estados cinéticos cerrados.

En la figura 3.21 se muestran distribuciones, en intervalos logarítmicos, de los tiempos de permanencia en el estado cerrado, a cuatro voltajes diferentes, a la derecha de cada distribución se indica el potencial aplicado. La línea continua corresponde al ajuste de máxima verosimilitud de la función 2.16 (sección 2.5.2.2) evaluada sobre las distribuciones. A todas las distribuciones de la figura 3.21, se les ajustó, una expresión de la función 2.16 que corresponde a la suma de tres componentes exponenciales. Las líneas discontinuas, representan la participación de cada uno de los tres componentes exponenciales en la distribución. Los valores de los parámetros de ajuste de todas las distribuciones están en la leyenda de la figura 3.21.

Para todos los potenciales, excepto para -120 mV, los ajustes con tres componentes exponenciales fueron significativamente mejores que el ajuste con dos componentes. Por ejemplo, en la distribución en que los tres componentes están más separados (-97 mV), los valores del logaritmo de las verosimilitudes, $L(\theta)$, para el ajuste con dos y tres componentes son 2315,24 y 2300,26, respectivamente, el valor de Chi cuadrado evaluado sobre la diferencia en los valores de $L(\theta)$ es 29,97 ($P < 0,005$, sección 2.5.2.2). Por lo tanto, el ajuste de esta distribución con tres componentes exponenciales es significativamente mejor que con dos exponenciales. Sin embargo, operando de la misma manera sobre la distribución a -120 mV, se concluye que el ajuste de tres componentes exponenciales no es significativamente mejor que el ajuste con dos componentes (Chi cuadrado = $8,0 \times 10^{-6}$, $P > 0,995$).

3.3.4 Efecto del voltaje sobre las distribuciones de tiempos de permanencia.

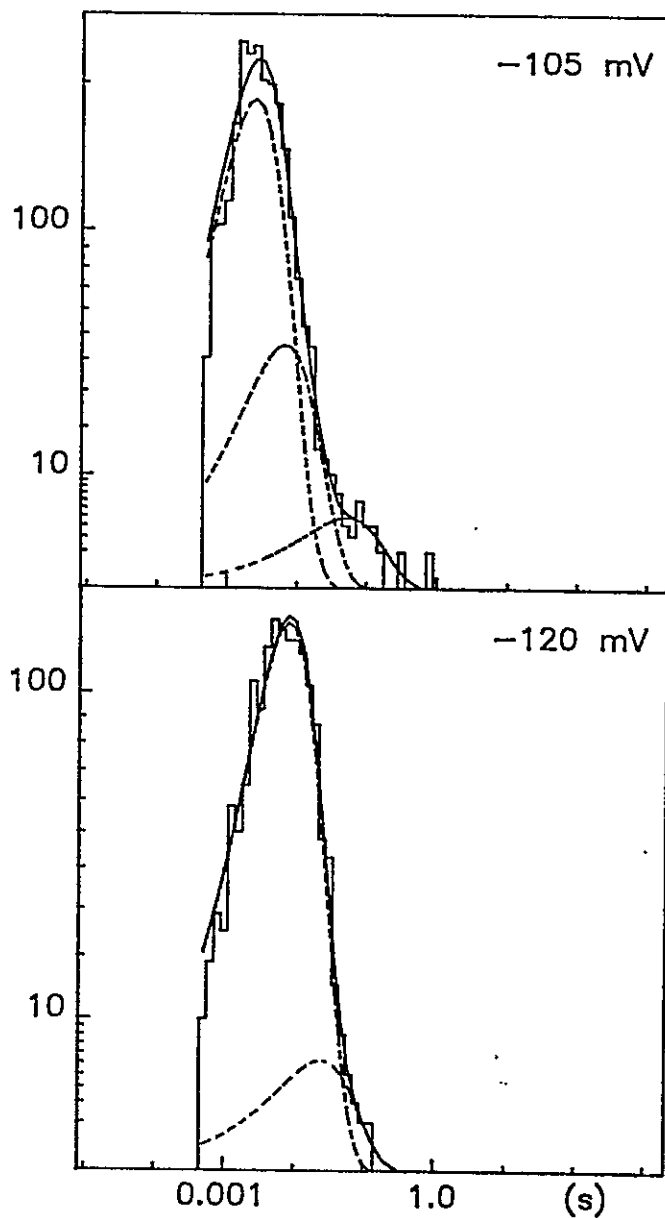
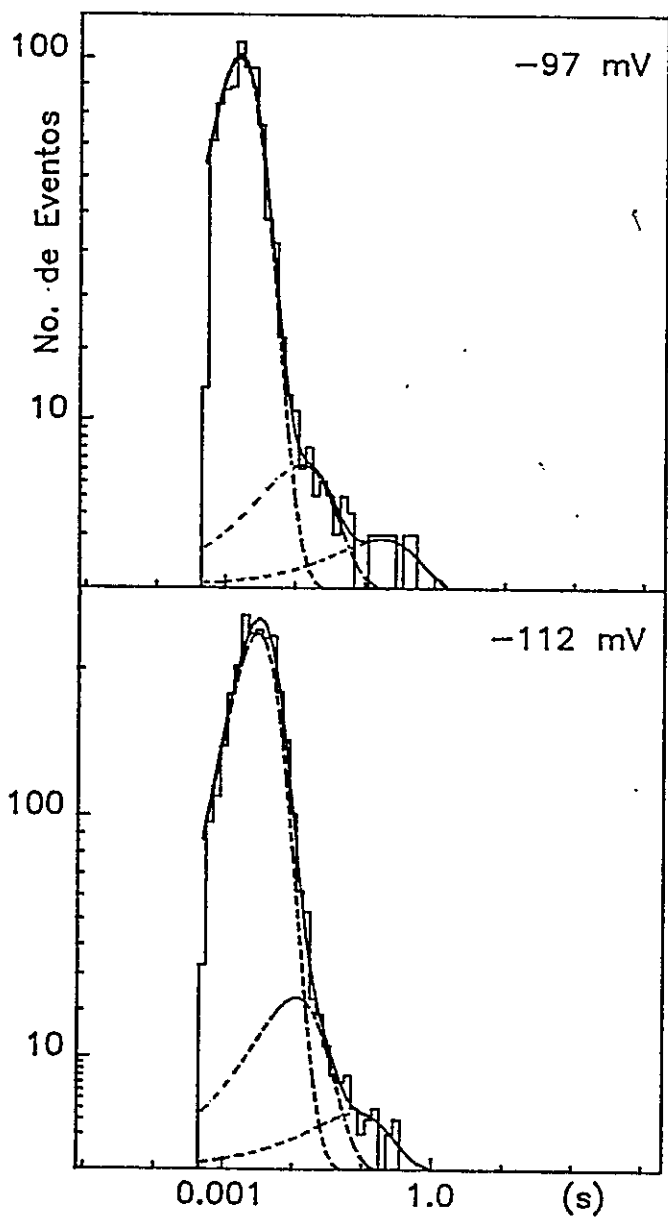
3.3.4.1 La duración de los eventos abiertos y de los cerrados depende del voltaje.

De los resultados de la sección anterior se concluye que el canal de Na^+ modificado por BTX posee por lo menos cinco estados cinéticos; dos estados abiertos y tres estados cerrados. En esta sección veremos que el voltaje afecta de manera diferente a cada uno de los estados cinéticos del canal.

Figura 3.21 Distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado cerrado.

Las distribuciones fueron construidas dividiendo el eje del tiempo en intervalos que crecen exponencialmente (métodos, sección 2.5.2.1). La ordenada representa la raíz cuadrada de la amplitud. La línea continua sobre las distribuciones corresponde a el ajuste de máxima verosimilitud de la ecuación 2.16 con tres componentes exponenciales (métodos, sección 2.5.2.2). Las líneas discontinuas corresponden a la participación de cada uno de los tres componentes exponenciales en cada distribución. Los potenciales aplicados están indicados en el extremo superior derecho de cada cuadro. Los parámetros de ajuste y el número de eventos de cada distribución son los siguientes:

mV	No. de Eventos	τ_{c3} , ms (A_3)	τ_{c4} , ms (A_4)	τ_{c5} , ms
-97	893	1,72 (0,91)	13,75 (0,08)	200,00
-105	2303	2,75 (0,79)	7,39 (0,19)	59,54
-112	2554	3,44 (0,90)	12,82 (0,09)	94,11
-120	1511	9,16 (0,96)	---	28,00



De la figura 3.20 se observa que las distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado abierto tienen un máximo cuya posición se desplaza con el potencial aplicado, por ejemplo, a -97 mV, la posición del máximo está cerca de 10 ms, en cambio, a -120 mV, la posición del máximo está cerca de 1 ms. El desplazamiento de la posición del máximo de las distribuciones se debe principalmente a un corrimiento del componente más rápido (O_2). Por otra parte, es posible apreciar que a todos los potenciales la posición del máximo del componente más lento de la distribución se encuentra en torno a 10. En resumen, las distribuciones de tiempos de permanencia en el estado abierto de la figura 3.20 indican la existencia de dos tipos de estados abiertos, un tipo de abierto tiene una duración promedio cercana a los 10 ms independientemente del voltaje aplicado (O_1), y el otro estado abierto cambia de ≈ 2 a ≈ 5 ms en un cambio de 30 mV (O_2). Además, la figura 3.20 muestra que la proporción de eventos del componente O_1 (más lento) se hace mayor a medida que el potencial aplicado es más positivo.

Las distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado cerrado de la figura 3.21 poseen un máximo cuya posición se desplaza con el potencial aplicado. Por ejemplo, a -97 mV, la posición del máximo está cercano a 1 ms, en cambio, a -120 mV, la posición del máximo está cerca de 10 ms. En todas las distribuciones, el desplazamiento de la posición del máximo se debe al desplazamiento del promedio del componente más rápido (y más numeroso) en las distribuciones (C_3). En cambio, para todos los potenciales, excepto para -120 mV, los promedios de los dos componentes más lentos de cada distribución se encuentran, cerca de 10 y 100 ms (C_4 y C_5 respectivamente). En resumen, las distribuciones de tiempos de permanencia en el estado cerrado de la figura 3.21 indican la existencia de tres tipos de cerrados, C_3 que cambia desde ≈ 10 a ≈ 1 ms entre -120 y -97 mV y, C_4 y C_5 que son relativamente independientes del voltaje. Por otra parte, se puede apreciar que la proporción en que cada componente se encuentra en la distribución no es tan fuertemente dependiente del voltaje como en el caso de las distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado abierto.

El hecho de que el ajuste con tres componentes de la distribución a -120 mV no sea significativamente mejor que con dos componentes (sección 3.3.3.2), puede ser explicado

suponiendo que a este potencial, el tiempo promedio de la población C_3 es cercano a 10 ms, y por lo tanto, enmascara el promedio de la población C_4 . A potenciales más negativos que V_0 , las distribuciones de tiempos de permanencia en el estado cerrado mostraron sistemáticamente sólo dos componentes exponenciales.

3.3.4.2 Efecto del voltaje sobre las constantes de tiempo de las distribuciones.

Debido al pequeño número de canales de sodio en los que en esta tesis se estudió sistemáticamente el efecto del voltaje sobre la cinética de apertura y cierre (dos canales en 200 mM Na^+ y tres en 3,0 M) y para entender el efecto del voltaje sobre las distribuciones de tiempos de permanencia, fue necesario agrupar los resultados obtenidos en 0,2 y en 3,0 M Na^+ para así obtener un solo conjunto de resultados. El criterio para el agrupamiento de los datos consistió en expresar todos los resultados del efecto del voltaje como función del potencial normalizado, $V-V_0$ (*). En las figuras 3.22 y 3.23 se han graficado cada una de las cinco constantes de tiempo y la fracción de eventos de cada componente cinético en función del voltaje normalizado, $V-V_0$.

En las figuras 3.22 y 3.23, cada simbolo representa los resultados de un experimento diferente; los círculos blancos y negros corresponden a los experimentos realizados en 200 mM Na^+ , los demás simbolos corresponden a experimentos en 3,0 M, la línea continua corresponde a los resultados del análisis de las distribuciones generadas a partir de las constantes cinéticas del canal 'tipo' de la sección 3.3.8. Además, en la figura 3.22, la línea discontinua corresponde a una regresión exponencial entre los valores de las constantes de tiempo y el voltaje.

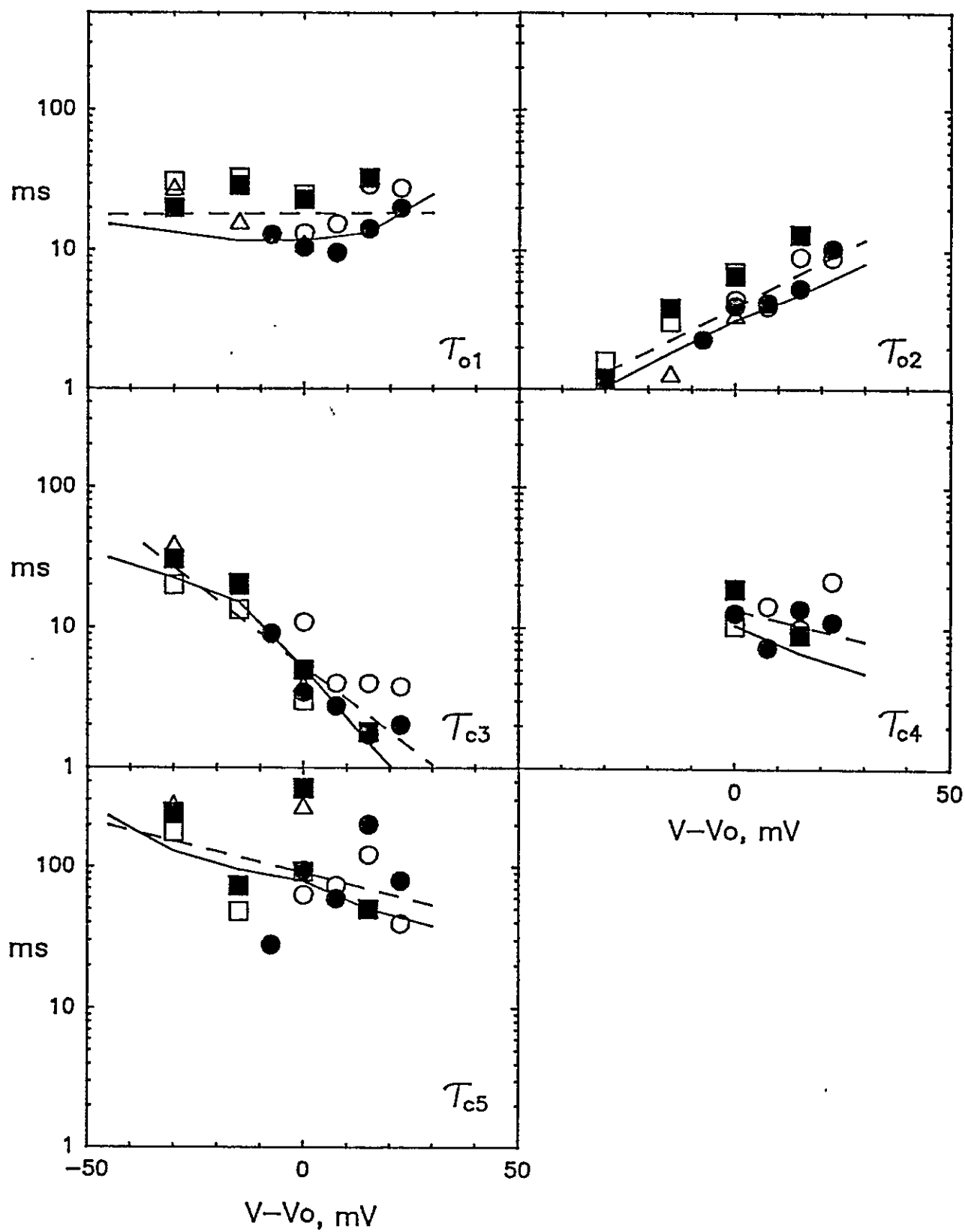
En la figura 3.22 se aprecia claramente que:

- i.- τ_{o1} y τ_{c4} son independientes del voltaje.
- ii.- τ_{o2} y τ_{c3} son afectadas por el voltaje de manera opuesta, τ_{o2} crece e veces por cada 25 mV de despolarización, en tanto, τ_{c3} crece e veces por cada 19 mV de hiperpolarización.
- iii.- τ_{c5} muestra una leve dependencia del voltaje,

(*) Este criterio es razonable puesto que si el desplazamiento de la curva de activación observada en 3,0 M con respecto a 0,2 M Na^+ solo se debe a modificaciones en el potencial de superficie, todas las constantes de tiempo de los cinco estado cinéticos descritos deben desplazarse en el eje del voltaje en la misma magnitud que la curva de activación.

Figura 3.22 Constantes de tiempo en función del voltaje normalizado.

Los voltajes se normalizaron suponiendo que los valores de V_o son: -112 (círculos negros) y -128 mV (círculos blancos) para los experimentos en Na^+ 200 mM y -60 mV los experimentos en Na^+ 3,0 M (triángulos blancos, cuadrados negros y blancos). En cada cuadro, el nombre de la constante de tiempo graficada se encuentra en el extremo inferior derecho, la línea discontinua corresponde a una regresión exponencial sobre todos los valores experimentales. La línea continua corresponde a los valores de las constantes de tiempo obtenidas del ajuste de máxima verosimilitud a las distribuciones de los tiempos de permanencia generadas con el modelo II, ellas se generaron a partir de los valores de $k_{ij}(V_o)$ y de n_{ij} del canal 'tipo' (tabla 3.5). Las distribuciones, fueron generadas a partir de registros simulados compuestos de 25000 transiciones, los eventos más breves que $590 \mu\text{s}$ (tiempo muerto cuando el nivel de filtro es de 300 Hz; -3 dB) fueron ignorados y su duración fue sumada a la del evento adyacente (métodos, secciones 2.5.2.5 y 2.5.2.6). Como resultado de este procedimiento, los porcentajes de eventos ignorados (eventos perdidos) fueron 75%, 45%, 29%, 20%, 30% y 66% a $V-V_o$ iguales a -45, -30, -15, 0, 15 y 30 mV, respectivamente.



decreciendo e veces por cada 65 mV de despolarización.

Por otra parte, a pesar de la gran dispersión de los datos de la fracción de eventos de cada componente exponencial, en la figura 3.23 se aprecia claramente que la despolarización aumenta la fracción de eventos pertenecientes al los componente τ_{o1} y τ_{o3} de las distribuciones de eventos abiertos y cerrados, respectivamente, en cambio, la fracción de eventos del componente τ_{o4} decrece con la despolarización.

En consecuencia, para resumir el efecto del voltaje sobre Po a partir de su efecto sobre las constantes de tiempo, podemos decir que la despolarización prolonga la duración del estado abierto más breve (O_2) y reduce la fracción de eventos abiertos que pertenecen a este estado; además, ella reduce la duración del estado cerrado más breve (C_3) y aumenta la fracción de eventos cerrados pertenecientes a este estado.

3.3.5. Los eventos cerrados breves son acompañados de eventos abiertos largos y los eventos cerrados largos son acompañados por eventos abiertos breves.

Los resultados de las secciones 3.3.3.1 y 3.3.3.2 muestran que el canal de sodio tiene a los menos *dos estados abiertos y tres estados cerrados*, lo que permite descartar al modelo lineal 1.7 (Introducción, sección 1.3.4), que tiene un sólo estado abierto. Por otra parte, los resultados presentados hasta este momento son insuficientes para aceptar como válido al esquema 1.8 que predice la existencia de dos estados abiertos, pues existen numerosos modelos posibles que son capaces de predecir el número de estados cinéticos encontrados, y por lo tanto, capaces de predecir las distribuciones de tiempos de permanencia encontrados. (Labarca y cols., 1985; Blatz y Magleby, 1986b, 1989; Ver próxima sección). Tales modelos se diferencian de acuerdo al modo en que cada uno de los estados cinéticos del canal se encuentra conectado a los demás. Así, si se examina la historia de transiciones entre los estados abiertos y cerrados, modelos cinéticos diferentes pueden generar historias diferentes, pero distribuciones idénticas de tiempos de permanencia.

Teóricamente, toda la información del modelo cinético subyacente a la secuencia de

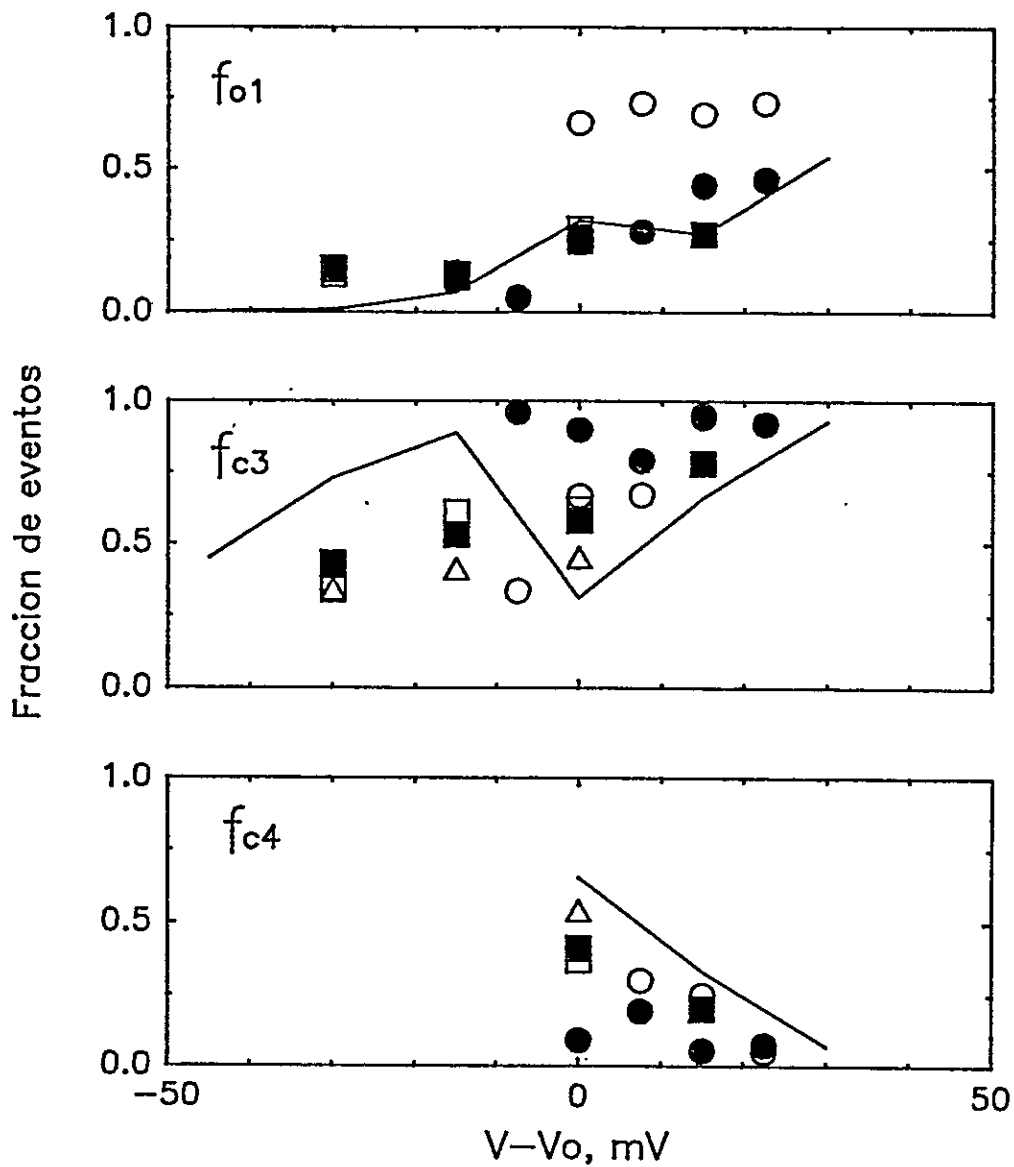


Figura 3.23 Fracción de eventos de cada componente exponencial en función del voltaje normalizado.

Los símbolos representan los mismos experimentos que en la figura 3.22. En cada cuadro, f_{o1} , f_{c3} y f_{c4} corresponden a la fracción de eventos de los componentes τ_{o1} , τ_{c3} y τ_{c4} , respectivamente. La línea continua corresponde a los valores de la fracción de eventos de cada componente en las distribuciones de los tiempos de permanencia generadas con el modelo II (ver leyenda de la figura 3.22).

transiciones y tiempos de permanencia de un registro dado de corrientes se encuentra en la distribución conjunta de eventos abiertos y cerrados adyacentes (Fredkin y cols., 1985). Así, para un modelo dado, la superficie de la distribución bidimensional generada está *unicamente determinada* aunque sus distribuciones separadas de eventos abiertos y cerrados puedan ser descritas también por otros modelos. Por lo tanto, para describir el comportamiento cinético de un canal iónico basta con ajustar la distribución conjunta de eventos abiertos y cerrados adyacentes. Sin embargo, para trabajar con distribuciones bidimensionales de tiempos de permanencia, el número de eventos requerido es uno o dos ordenes de magnitud mayor que los obtenidos en esta tesis, pues, en vez de distribuir las duraciones en 80 intervalos logarítmicos, el mismo conjunto de datos debe distribuirse en una matriz de 80x80 intervalos.

En lo que sigue, se describe la metodología usada para hacernos a un modelo que describa la cinética de apertura y cierre del canal de Na^+ modificado por BTX.

3.3.5.1. Análisis de correlación entre eventos adyacentes.

Para obtener alguna idea preliminar del modo en que los diferentes estados cinéticos de este canal se encuentran conectados entre sí, es conveniente hacer una inspección ocular de los registros de corriente y mirar la historia de transiciones entre los estados abiertos y cerrados del canal.

En los registros expandidos de la figura 3.2B es posible observar que el canal posee por lo menos dos modos de actividad cinética; uno de ellos está compuesto de eventos abiertos 'largos' interrumpidos por cierres breves del canal (marcado con una línea horizontal bajo el registro de corriente); el otro modo está compuesto de eventos cerrados 'largos' interrumpidos por aperturas breves (marcado con una línea horizontal sobre el registro). Además, estos dos modos de actividad se observan más claramente a potenciales más negativos.

En cada registro como los mostrados en la figura 3.2B, si se mide la duración de todos los eventos abiertos adyacentes a un evento cerrado 'largo', su promedio será mayor que el promedio de todos los eventos abiertos del registro y, por supuesto, mayor que la duración promedio de los

eventos abiertos adyacentes a un evento cerrado 'corto'. En consecuencia, se encontraría una correlación inversa entre la duración de eventos abiertos y cerrado adyacentes (métodos, sección 2.5.2.3; McMannus y cols., 1985; Kerry y cols., 1988; Blatz y Maglegy, 1989; Keller y cols., 1990). En este trabajo se utilizó este tipo de análisis con el propósito de confeccionar un modelo cinético que dé cuenta de las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado y que explique la dependencia del voltaje que presenta la cinética de los canales de sodio modificados por BTX.

Para hacer el análisis de correlación entre las duraciones de eventos cerrados y abiertos adyacentes, se definió un conjunto de intervalos de tiempo (intervalos condicionantes; métodos, sección 2.5.2.3). Para cada intervalo condicionante, el análisis se desarrolla así: i.- se recorre el registro idealizado de corriente, ii.- se identifican todos los eventos cerrados cuya duración se encuentra dentro del intervalo condicionante. iii.- se calcula el promedio de todos los eventos abiertos que están adyacentes a cada uno de estos eventos cerrados.

La figura 3.24 muestra un resumen de los resultados del análisis de correlación del canal al cual pertenecen las distribuciones de tiempos de permanencia de la figura 3.20 y 3.21. Los valores de la ordenada de la figura 3.24 corresponden al promedio de las duraciones de todos los eventos abiertos adyacentes a un evento cerrado cuya duración queda dentro de un intervalo condicionante. La abscisa representa el valor central (en unidades logarítmicas) del intervalo condicionante. Los resultados que se muestran, corresponden a tres diferentes voltajes, -97, -112, -120 mV. Cada punto corresponde al promedio de, por lo menos, 100 eventos abiertos. En cada conjunto de puntos, a cada voltaje, la línea continua representa la duración promedio de todos los eventos abiertos del registro de corriente.

En la figura 3.24 se puede observar que, a medida que el intervalo condicionante se desplaza hacia las duraciones mayores, existe una tendencia decreciente en los valores de la duración promedio de los abiertos adyacentes. Por ejemplo, en los valores de tiempo cerrado condicionantes cercanos a un milisegundo, la duración promedio de los abiertos adyacentes es mayor que la duración promedio de todos los eventos abiertos de cada registro. En cambio, con

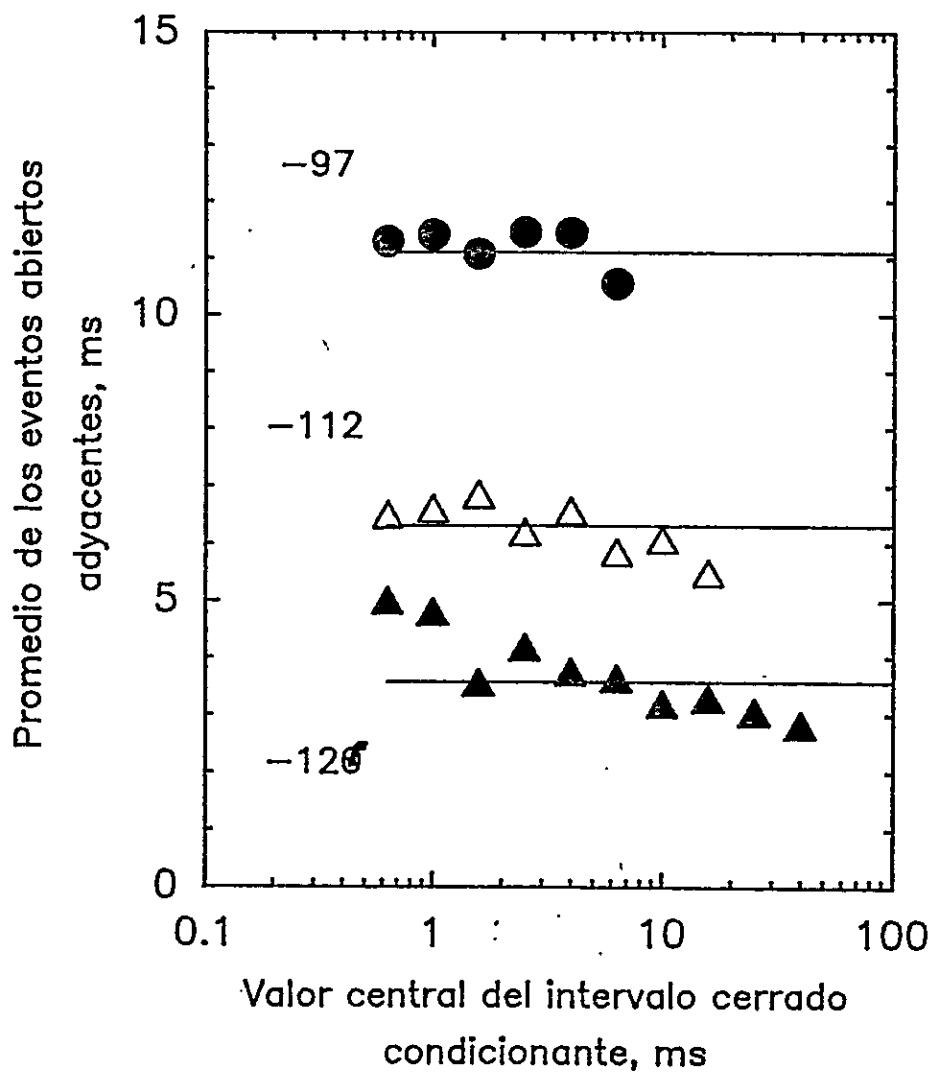


Figura 3.24. Análisis de correlación entre eventos abiertos y cerrados adyacentes.

Los valores graficados corresponden al promedio de por lo menos 100 eventos. El promedio de la duración todos los eventos abiertos de los registros a cada voltaje son representados por líneas horizontales, los promedios a -97, -112 y -120 mV son 11,1, 6,32, y 3,57 ms, respectivamente.

cerrados condicionantes mayores que 10 milisegundos, la duración promedio de los abiertos adyacentes es menor que la duración promedio de de los eventos abiertos de todo el registro. Además, esta figura muestra que la tendencia decreciente se acentúa a potenciales cada vez más negativos. En resumen, la correlación inversa que se encuentra entre la duración de eventos abiertos y cerrados adyacentes indica que, en el canal de sodio, los cerrados breves son flanqueados por abiertos de mayor duración que el promedio de todos los abiertos, en cambio, los cerrados de larga duración son flanqueados por abiertos más breves que el promedio.

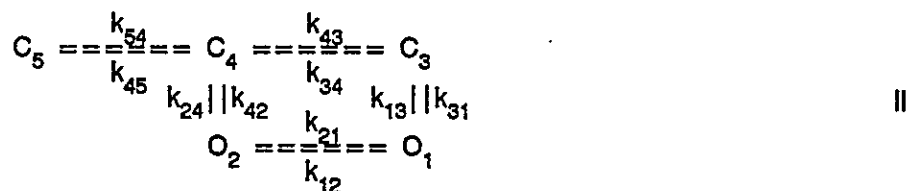
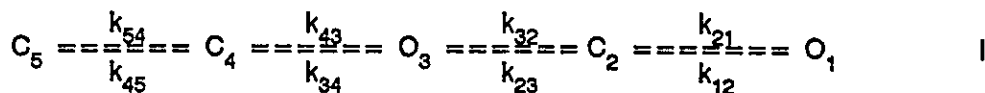
Estos resultados son incompatibles con cualquier modelo cinético que tenga un solo estado abierto, pues, en estos modelos, independientemente de la duración del cerrado en que el canal se encuentre, este es abandonado siempre hacia a la misma población de abiertos y, por lo tanto, el promedio de los eventos abiertos adyacentes no debiera cambiar con la duración del cerrado condicionante. Esta es una demostración independiente de que el canal tiene más de un estado abierto.

3.3.6 Modelos cinéticos.

Los resultados de la sección anterior establecen dos condiciones para un modelo cinético: i.- debe existir un correlación inversa entre las duraciones de los eventos abiertos y cerrados adyacentes y ii.- la tendencia de la correlación negativa debe acentuarse a potenciales más negativos. En consecuencia, los modelos que den cuenta del comportamiento cinético del canal de sodio deben cumplir con las condiciones i y ii. En la práctica, dado el extenso trabajo computacional que implica probar, a diferentes voltajes, cada uno de los modelos (ver métodos, sección 2.4.2.4), ellos se probaron a un solo voltaje, por lo tanto, sólo se les exigió la primera condición.

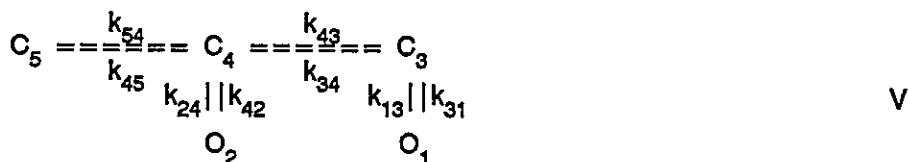
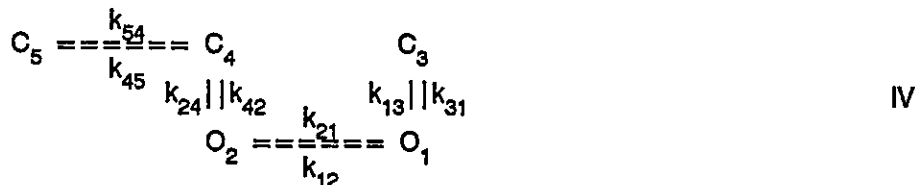
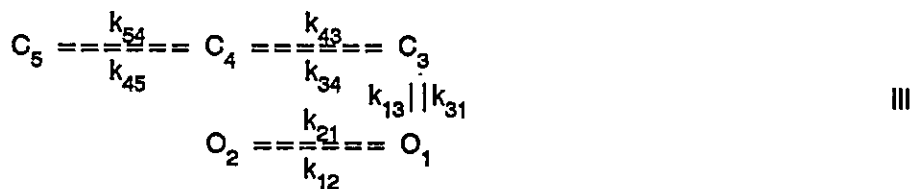
Los modelos cinéticos propuestos deben permitir que los diferentes estados abiertos puedan ser abandonados hacia distintos estados cerrados. Los modelos cinéticos de este tipo dan origen a correlaciones inversas entre las duraciones de abiertos y cerrados (Colquhoun y Hawkes, 1983; MacManus y cols., 1985; Blatz y Magleby, 1989). Por esta razón, todos los modelos probados

son derivados de dos esquemas básicos:



En estos modelos, los O_i y C_j denotan los estados abiertos y cerrados, respectivamente, los k_{ij} denotan las constantes cinéticas de la transición desde el estado I al estado J.

Puesto que el modelo II es cíclico, es posible simplificarlo haciendo nulos algunos pares de constantes cinéticas, y con este procedimiento, se puede reducir a los siguientes esquemas:



3.3.7 Ajuste de las distribuciones de tiempos de permanencia y selección de modelos.

Para evaluar los diferentes modelos cinéticos, ellos se probaron con registros prolongados de canales a un solo voltaje. En estos registros, el número de eventos colectados fue considerablemente mayor que en aquellos en que se estudió el efecto del voltaje y, por lo tanto, son más adecuados para probar los modelos cinéticos a un sólo voltaje.

3.3.7.1. Ajuste de las distribuciones de tiempos de permanencia con los modelos cinéticos.

En la figura 3.25A se aprecia el registro de un canal de sodio tomado a -100 mV y en NaCl 200 mM en ambos lados de la bicapa. En este trazo se ha marcado con líneas horizontales sobre el registro aquellas zonas donde se presentan cerrados de larga duración acompañados de abiertos breves (que, en las distribuciones, corresponderían a τ_{o2} y τ_{o4}). Las líneas horizontales que se encuentran bajo el registro señalan aquellas zonas donde se presentan abiertos de larga duración acompañados de cerrados breves (τ_{o1} y τ_{o3}). Las zonas donde no se presenta ninguna marca corresponden a cerrados de larga duración (que, en la distribución de eventos cerrados, corresponderían a la población de mayor duración, τ_{c5}).

La figura 3.25B muestra las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado de este canal, en estas distribuciones se aprecian claramente los dos componentes de la distribución de los abiertos y los tres componentes de la distribución de los cerrados.

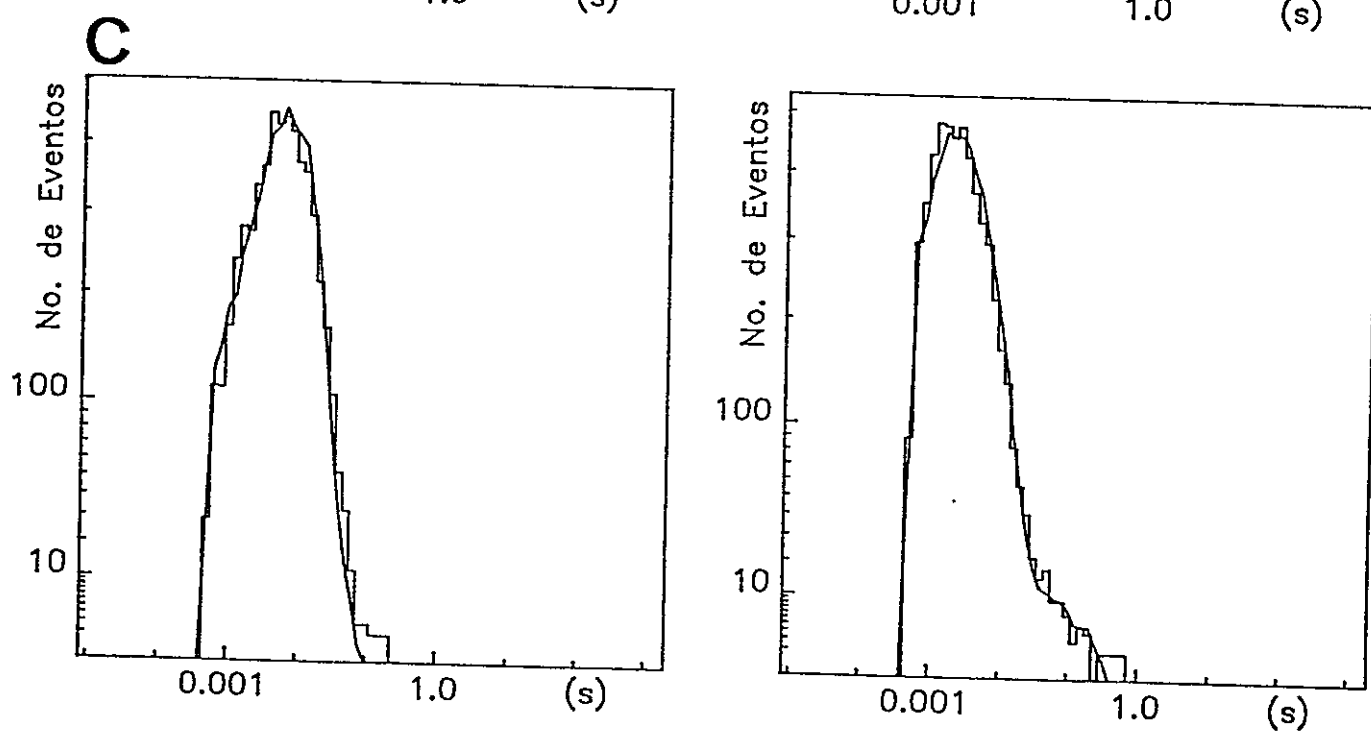
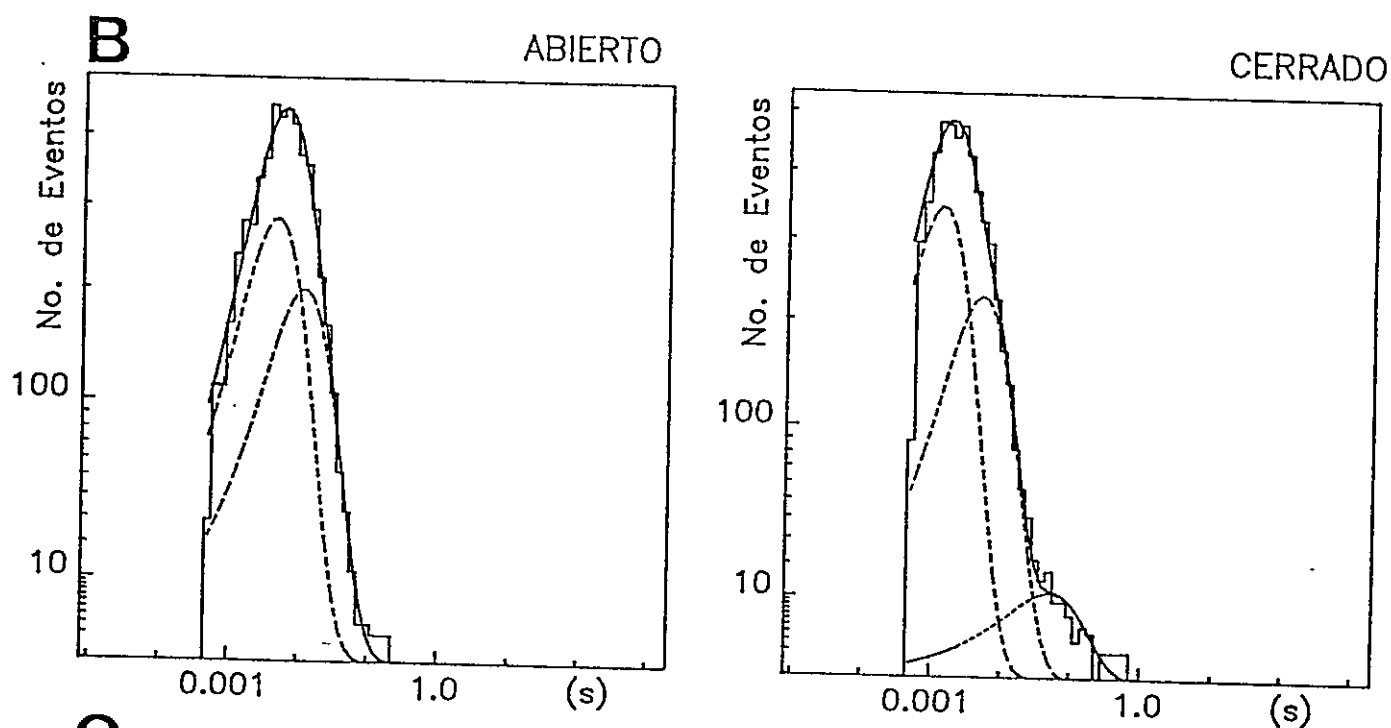
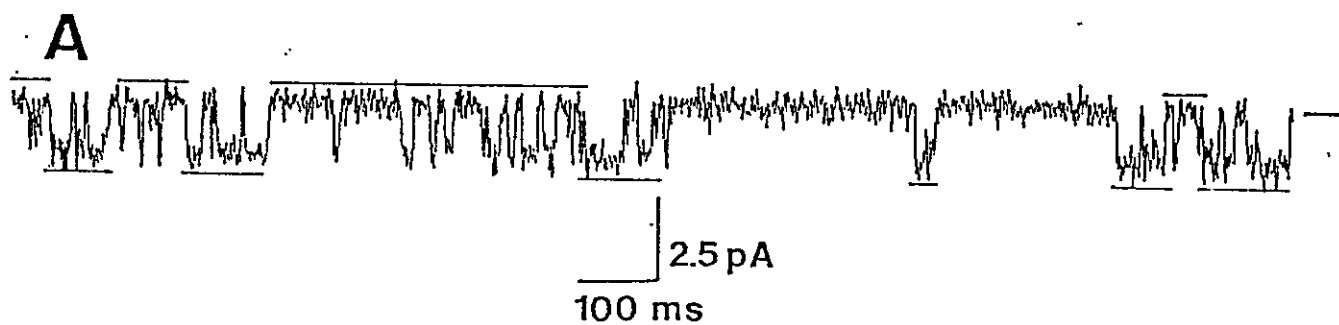
La figura 3.25C muestra un ejemplo del tipo de ajustes que se obtienen cuando, a partir de un conjunto dado de constantes cinéticas, se simulan registros de 10^5 eventos y se comparan con las distribuciones experimentales (métodos, sección 2.5.2.4). En esta figura se muestra el ajuste de las distribuciones de las duraciones de los eventos abiertos y cerrados del canal que se muestra en la figura 3.25A. En la tabla 3.4 se muestran los valores del logaritmo de la verosimilitud de los ajustes de cada modelo para el canal de la figura 3.25. Sobre la base de la prueba de Chi cuadrado no fue posible discriminar cual de todos los modelos entrega un mejor ajuste a las distribuciones, pues, con las mismas constantes de velocidad y diferentes conjuntos de números aleatorios, se obtienen valores de verosimilitudes que varían en varios ordenes de magnitud. Este tipo de resultados sugiere que, para el tipo de ajuste de distribuciones que se muestra en esta tesis, la posición de algún modelo dentro de una escala de mejor a peor ajuste, depende fuertemente del conjunto de números aleatorios o del algoritmo que los genere, y que, por lo tanto, el valor de la verosimilitud del ajuste no es adecuado para discriminar diferentes modelos.

Figura 3.25 Distribuciones de los tiempos de permanencia y ajuste con los modelos cinéticos.

A.- Registro de un canal de sodio modificado por BTX en Na^+ 200 mM en ambos lados de la bicapa. El canal fue registrado a -100 mV y filtrado a 300 Hz (-3 dB). La línea horizontal extremo derecho del registro indica la corriente correspondiente al canal cerrado. Las líneas horizontales sobre y bajo el registro fueron trazadas a ojo y representan los sectores en que el canal presentaba eventos 'cerrados largos' adyacentes a eventos 'abiertos cortos' y eventos 'abiertos largos' acompañados por 'cerrados cortos'. Los eventos de cierre con duración mayor que 200 ms no fueron marcados. El valor de P_o para esta canal 0,64.

B.- Distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado obtenidas a partir del canal del panel A. La línea continua representa el ajuste de máxima verosimilitud de la ecuación 2.16 con dos y tres componentes exponenciales para los eventos abiertos y cerrados, respectivamente. Los valores de las constantes de tiempo para los eventos abiertos son: $\tau_{o1} = 11,60$ ms ($A_1 = 0,47$) y $\tau_{o2} = 4,53$ ms. Las constantes de tiempo para los eventos cerrados son: $\tau_{c3} = 1,52$ ms ($A_3 = 0,59$), $\tau_{c4} = 5,75$ ms ($A_4 = 0,39$) y $\tau_{c5} = 58,08$ ms. 5623 eventos.

C.- Ajuste de máxima verosimilitud a las distribuciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado. La línea continua sobre la distribución experimental corresponde a una distribución generada a partir del modelo II. A partir del modelo II se generó un registro de 10^5 eventos, todos los eventos más breves que 590 μs (tiempo muerto cuando el nivel de filtro es de 300 Hz) fueron ignorados y su duración fue sumada a la del evento adyacente (métodos, secciones 2.5.2.5 y 2.5.2.6). Como resultado de este procedimiento, el número de eventos ignorados (eventos perdidos) fue ≈ 30.000 . La distribución generada a partir de los eventos detectados fue puesta a escala con la distribución experimental. Las distribuciones generadas a partir de los demás modelos se superponen casi completamente con esta distribución y el número de eventos de perdidos que genera cada uno de ellos es ≈ 30.000 . El valor de verosimilitud alcanzado por este modelo se muestra en la tabla 3.4 (conjunto 2 de números aleatorios).



3.3.7.2. Selección de modelos cinéticos.

En la sección 3.3.5 se muestra que existe una correlación inversa entre las duraciones de los eventos abiertos y cerrados adyacentes. Sin embargo, a pesar de que cada uno de los modelos puede describir igualmente bien las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado, es posible esperar que cada modelo genere distintos grados de correlación entre las duraciones de eventos adyacentes, pues, en cada modelo cinético los distintos estados abiertos y cerrados están conectados de manera diferente.

A partir de los cinco modelos propuestos, se generaron registros simulados de actividad de un canal (25000 eventos; métodos, sección 2.5.2.5), a estos registros se les sometió al análisis de correlación entre eventos adyacentes (métodos, sección 2.5.2.4) y los resultados de este análisis aplicados al canal de la figura 3.25 son mostrados en la figura 3.26. En esta figura, se muestran los resultados del análisis de correlación aplicados sobre cada modelo (círculos negros) y comparados con el resultado del análisis sobre el registro experimental (línea continua). Al extremo inferior de cada cuadro se muestra esquemáticamente el modelo probado.

En el primer caso (modelo III) se aprecia que independientemente de las duraciones que incluya el intervalo cerrado condicionante, la duración promedio de los eventos abiertos adyacentes es relativamente constante, es decir, no existe correlación entre las duraciones de eventos cerrados y abiertos adyacentes. Este resultado no es sorprendente, pues, este modelo pertenece a una familia de modelos lineales en los cuales todos los estados abiertos están contiguos y conectados a través de uno sólo de ellos a todos los estados cerrados (también contiguos). La ausencia de correlación entre las duraciones de los eventos adyacentes ha sido un resultado común cuando a este tipo de modelos, se le han aplicado este tipo de análisis (Labarca y cols., 1985; McMannus y cols., 1985; Blatz y Magleby, 1989; Keller y cols., 1990). Por otra parte, en todos los demás modelos probados, se puede observar que a medida que el intervalo condicionante se desplaza hacia tiempos mayores, el promedio de los eventos abiertos adyacentes se hace cada vez menor. Sin embargo, en todos ellos, con la excepción del modelo cíclico (modelo II), el grado de correlación inversa es mayor que en registro experimental. Así, sólo a partir del

Tabla 3.4

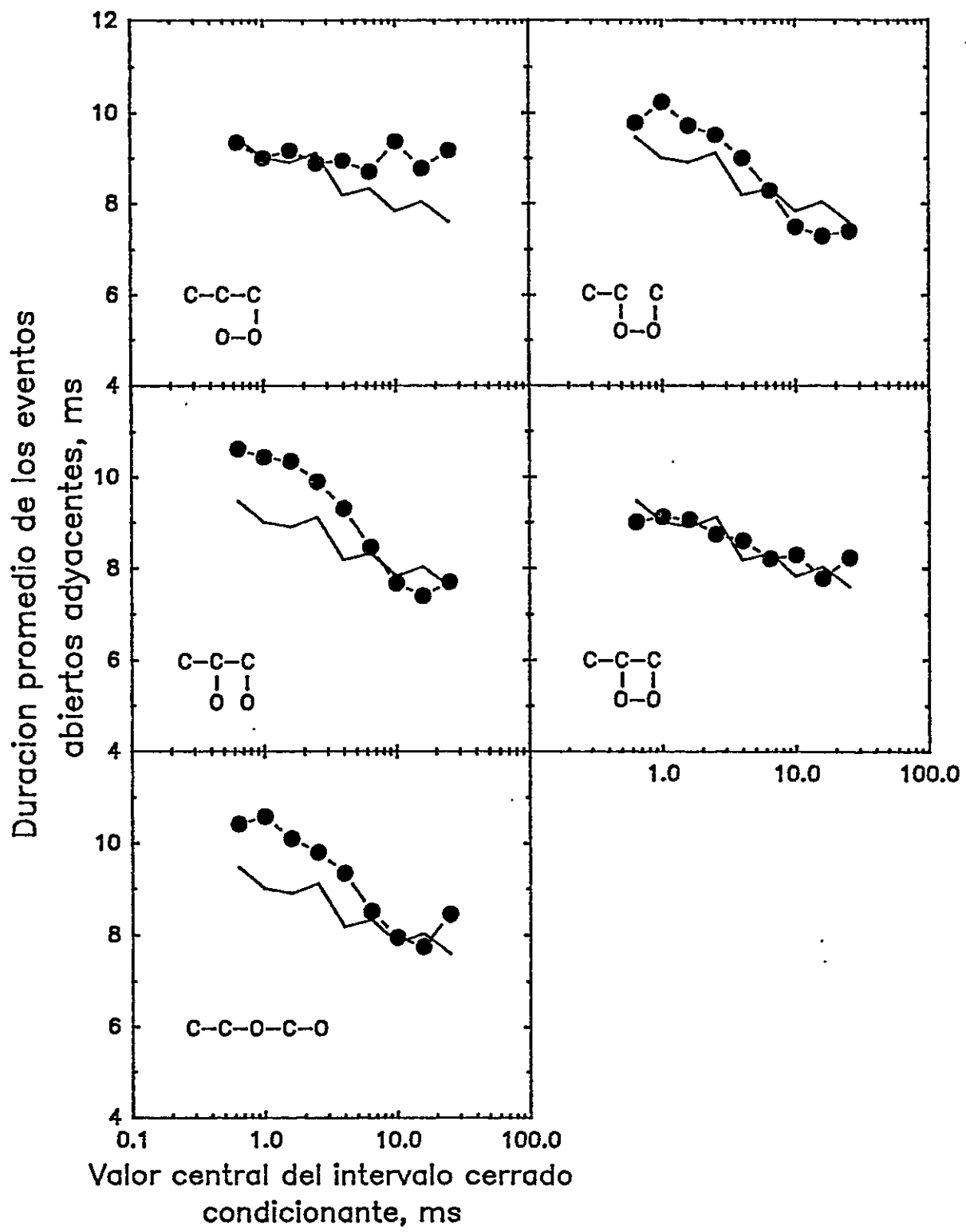
Valores de $L(\theta)$ obtenidos a partir del ajuste de los datos de la figura 3.25 con dos conjuntos de números aleatorios

Modelo	L(θ)	
	Conjunto 1	Conjunto 2
I	31564.11 (4)	30039.30 (1)
II	30104.27 (1)	30076.00 (5)
III		30054.35 (4)
IV	31503.93 (2)	30039.59 (2)
V	31520.88 (3)	30048.06 (3)

Los valores del logaritmo de la verosimilitud, $L(\theta)$, fueron obtenidos a partir del mismo conjunto de constantes cinéticas para cada modelo. El conjunto de números aleatorios no. 1 fué obtenido a partir de la función RAN del lenguaje FORTRAN que funciona con la tarjeta Definicon. El conjunto 2 fué obtenido a partir de la subrutina RAN2 de Press y cols., 1986. Los números entre parentesis indican la posición del modelo en una escala de mejor a peor ajuste. La constante cinética k_{54} fue fijada en el el valor recíproco de τ_{c5} , esto fue hecho por dos razones: I.- Dado el reducido número de eventos pertenecientes al componente τ_{c5} , la participación de este componente en el valor de la verosimilitud de toda la distribución es muy pequeña, por esta razón, con frecuencia el ajuste de las distribuciones convergía a soluciones que ignoraban a este componente. II.- El tiempo de computación requerido para llegar a una solución se reducía en varias horas. Así, para los modelos I, III, IV y V, el número de constantes cinéticas usadas como parámetros ajustables fueron las siete restantes. Además, el modelo II tiene incorporada la condición de reversibilidad microscópica, brevemente, esto significa que el producto de las constantes cinéticas en un sentido del ciclo debe ser igual al producto de las constantes en sentido contrario (Denbigh, 1951, ver leyenda de la figura 3.28).

Figura 3.26. Análisis de correlación entre eventos adyacentes de los registros simulados con los modelos cinéticos.

La línea continua corresponde al análisis de correlación aplicado al canal que se muestra en la figura 3.28. Los círculos negros corresponden al análisis de correlación de registros simulados compuestos por 25.000 eventos. Cada registro fue simulado a partir de las constantes cinéticas obtenidas por el método de máxima verosimilitud para cada uno de los modelos (métodos, sección 2.5.2.4; los valores de la verosimilitud alcanzada se muestran en la tabla 3.4, conjunto 2). Antes de hacer el análisis de correlación entre eventos adyacentes, todos los eventos más breves que $590 \mu\text{s}$ fueron ignorados y su duración fue sumada a la del evento adyacente (métodos, secciones 2.5.2.5 y 2.5.2.6). Los modelos cinéticos se muestran en el extremo inferior izquierdo de cada cuadro. Cada uno de los valores experimentales graficados representa el promedio de por lo menos 100 eventos abiertos.



modelo cíclico se obtienen correlaciones entre eventos adyacentes que son comparables con las obtenidas experimentalmente.

3.3.8 Constantes de cinéticas y su dependencia del voltaje.

Sobre la base de los resultados de la sección anterior, se ajustaron las distribuciones de los tiempos de permanencia con el modelo II y a diferentes voltajes. En estos ajustes, la constante k_{12} fue fijada en 10 s^{-1} , pues, el valor de $L(\theta)$ era muy insensible al valor de esta constante, además, con el objetivo de reducir el tiempo de computación, la constante k_{54} se fijó en el valor recíproco de la constante de tiempo más lenta de la distribución de los eventos cerrados. En la figura 3.27, se muestran los ajustes de las funciones de densidad de probabilidad derivadas a partir de los registros simulados con el modelo II, a tres potenciales, -97, -112 y -120 mV. En esta figura, el ajuste generado por la simulación está representado por una línea continua sobre la distribución experimental. En ella se aprecia que las distribuciones simuladas siguen con bastante fidelidad a las distribuciones experimentales, excepto en aquellas zonas que corresponden al componente más lento de las distribuciones de tiempos de permanencia en el estado cerrado (τ_{c5}). Esto es debido a que, dado el pequeño número de eventos de este componente en la distribución experimental, también es pequeño el número de eventos simulados de este componente (entre 500 y 3000 eventos).

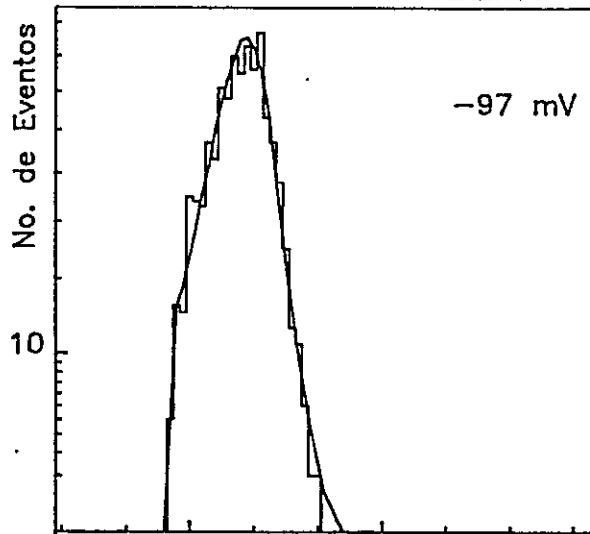
En las figuras 3.28A y 3.28B, se resumen los resultados del ajuste del modelo II a las distribuciones de tiempos de permanencia, de un experimento en 0,2 M y un experimento en 3,0 M Na^+ , respectivamente, en ellas se muestran el efecto del voltaje sobre las constantes cinéticas de cada rama del modelo II. Los resultados de estos dos canales han sido seleccionados con el objeto de mostrar que en estas dos condiciones experimentales el mecanismo de compuertas del canal se mantiene invariante.

En la figura 3.28, se puede observar que todas las constantes cinéticas son afectadas de manera distinta por el voltaje aplicado. Por ejemplo, en las figuras 3.28A y 3.28B se puede apreciar que las constantes cinéticas de la rama $C_4 - C_3$, k_{34} y k_{43} , muestran dependencias del voltaje que

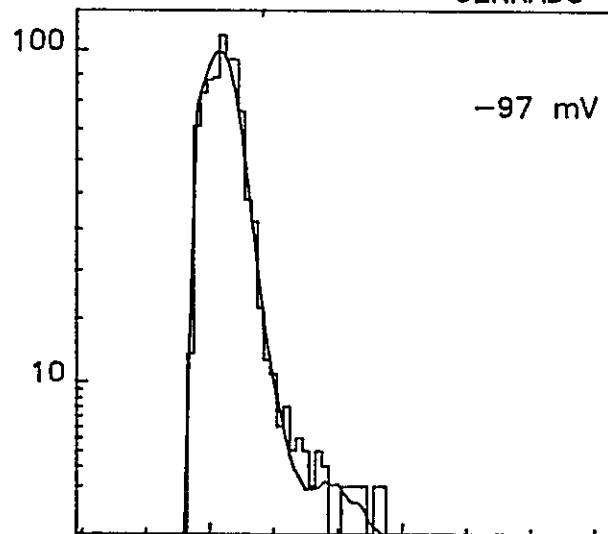
Figura 3.27. Modelo II: Ajuste de máxima verosimilitud de las distribuciones experimentales a tres diferentes voltajes.

Las distribuciones que se muestran son las mismas que se mostraron en las figuras 3.20 y 3.21. En los lados izquierdo y derecho de la figura se muestran las distribuciones de eventos abiertos y cerrados, respectivamente. Los voltajes están indicados en el extremo superior derecho de cada cuadro. Cada par de distribuciones (de eventos abiertos y cerrados) corresponde a 10^5 eventos generados, de estos eventos, todos aquellos más breves que $590 \mu\text{s}$ fueron considerados eventos perdidos. Los valores de las constantes cinéticas a partir de las cuales se construyeron las distribuciones se encuentran en la figura 3.31.

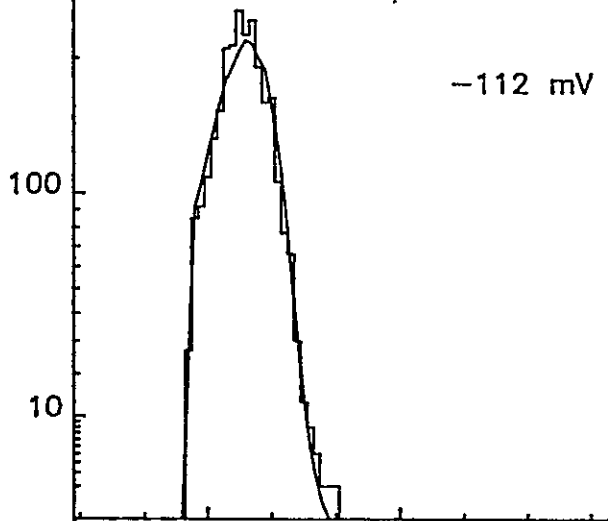
ABIERTO



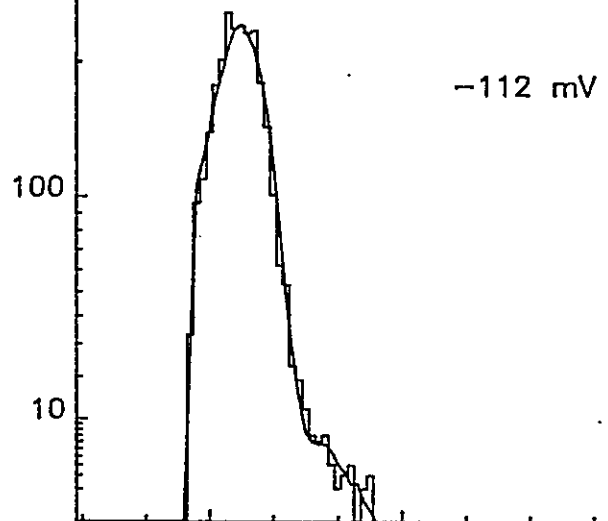
CERRADO



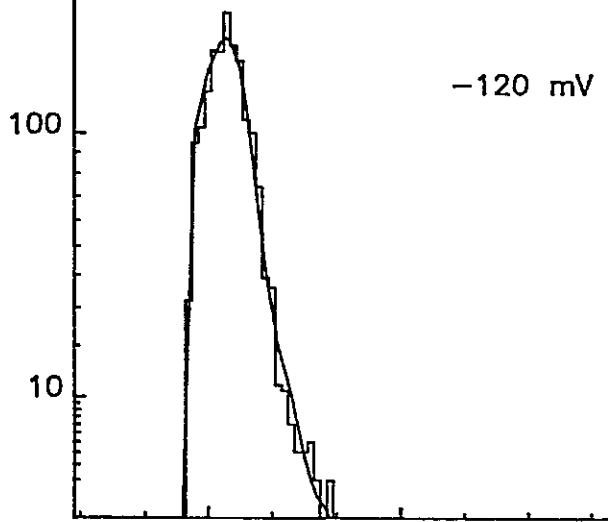
-112 mV



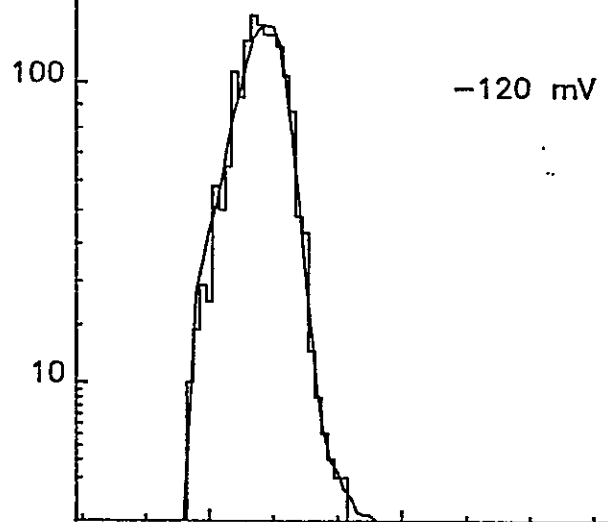
-112 mV



-120 mV



-120 mV



0.001 1.0 (s)

0.001 1.0 (s)

son opuestas, k_{34} decrece con la despolarización, en cambio, k_{43} disminuye. Por otra parte, en ambas figuras, es posible observar que en la rama $C_3 - O_1$, k_{31} crece con la despolarización, en cambio, k_{13} es poco afectada por el voltaje. Una situación parecida a esta se produce en la rama $C_4 - O_2$, k_{42} es cambia poco con el voltaje, en cambio, k_{24} decrece con la despolarización. k_{21} , la constante calculada a partir de las demás por el principio de reversibilidad microscópica (Ver leyenda de la figura 3.28) y la constante que lleva al canal hacia el estado C_5 (k_{45}) crecen con la despolarización.

Lo más notable de las figuras 3.28A y 3.28B es que, independientemente del voltaje, los valores de k_{13} y k_{42} son cercanos a 100 s^{-1} , estos resultados dan cuenta de que la duración promedio de los estados O_1 y C_4 es relativamente independiente del voltaje y cercana a 10 ms (τ_{o1} y τ_{o4} en la figura 3.22). Además, la magnitud y la dependencia del voltaje que muestran las constantes k_{24} y k_{31} sugiere que ellas son las constantes más importantes en determinar la duración de los componentes dependientes del voltaje de las distribuciones de tiempos de permanencia (τ_{o2} y τ_{o3} , respectivamente).

Que las constantes cinéticas sean modificadas por el voltaje implica que, dentro de el canal existen grupos cargados o dipolos que se reordenan cuando se produce un cambio de voltaje. En esta visión, una transición (dependiente del potencial) desde un estado a otro, está asociada a un desplazamiento de cargas en el campo eléctrico (Hodgkin y Huxley, 1952; Introducción, sección 1.2.2.2). La manera más sencilla de explicar el efecto del voltaje sobre la constante cinéticas de la transición entre los estados I y J (k_{ij}) es suponer el potencial modifica la altura de la barrera de energía entre estados I y J, entonces, la constante cinética, $k_{ij}(V)$, dependerá monotonamente del voltaje. Además, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en diferentes condiciones experimentales, es conveniente expresar el voltaje con respecto a V_0 . Por lo tanto, podemos escribir:

$$k_{ij}(V-V_0) = k_{ij}(V_0) \exp(-n_{ij}F(V-V_0)/RT), \quad (3.3)$$

en que $k_{ij}(V_0)$ es la constante cinética de transición desde I a J cuando el canal se encuentra la mitad del tiempo en el estado abierto, n_{ij} es la valencia efectiva del desplazamiento de cargas

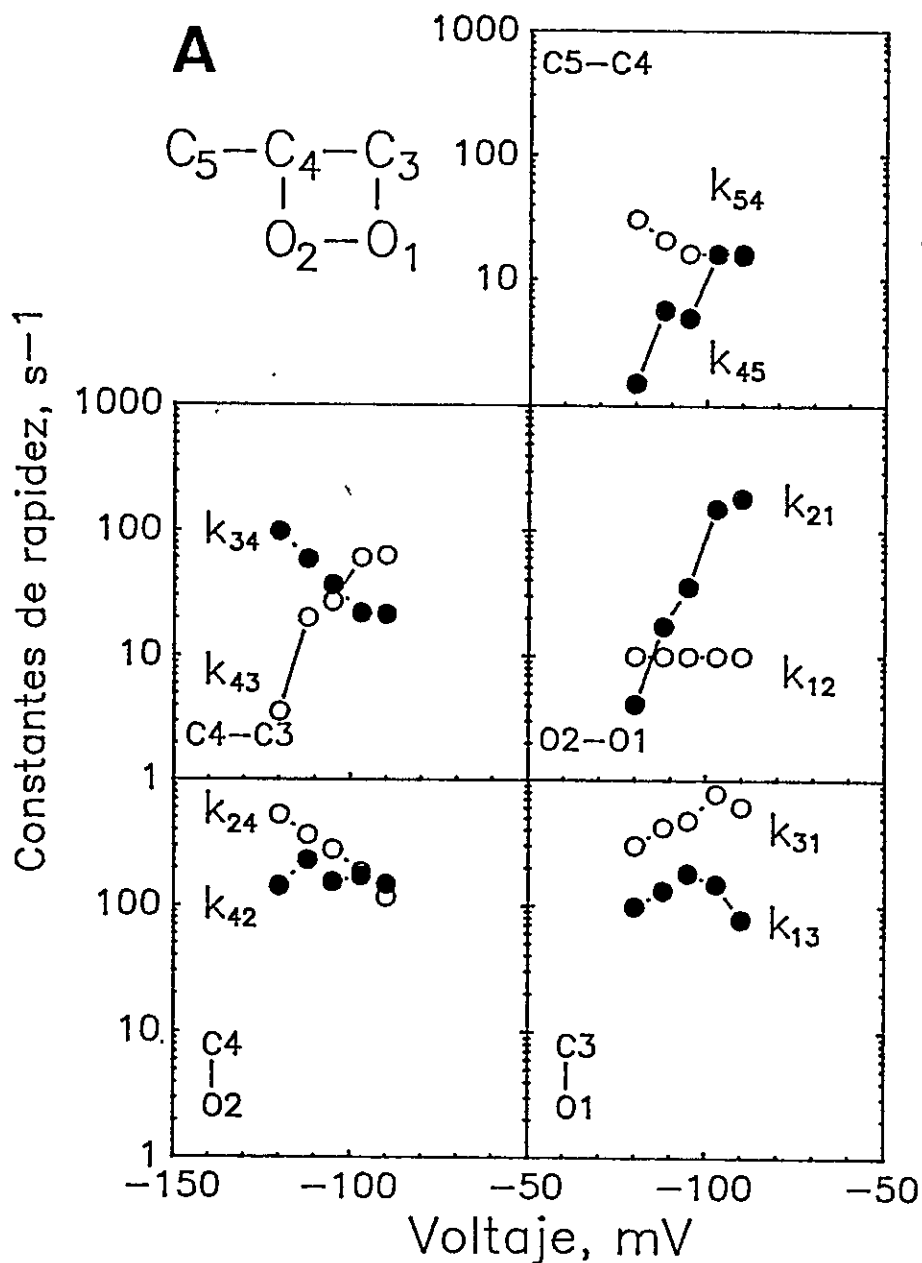
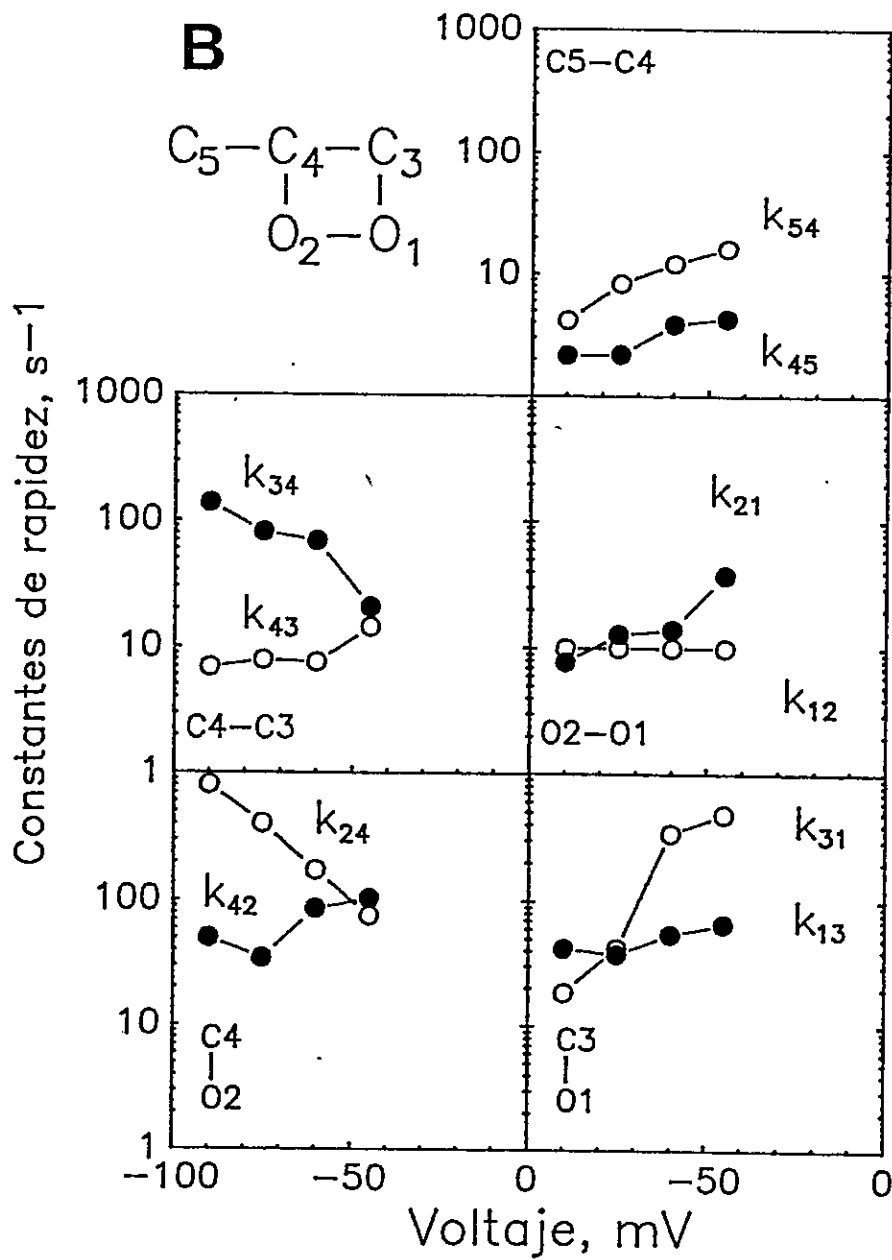


Figura 3.28. Efecto del voltaje sobre las constantes cinéticas del modelo II.

A.- 200 mM de Na^+ .

B.- 3,0 M Na^+ .

Las constantes cinéticas graficadas han sido obtenidas con el método de máxima verosimilitud. Cada una de los cuadros representa una rama del esquema cinético. Para estos ajustes, la constante k_{12} se dejó fija en $10 s^{-1}$, la constante k_{21} se determinó mediante la expresión: $k_{21} = k_{12} k_{24} k_{43} k_{31} / k_{13} k_{34} k_{42}$



asociado a la transición entre los estados I y J. F, R y T tienen sus significados usuales.

En la tabla 3.5 se muestran los valores obtenidos de $k_{ij}(V_0)$ y n_{ij} , a partir de la ecuación 3.3, para cada una de las constantes cinéticas de los cinco experimentos.

De esta tabla se puede apreciar que los valores de las constantes cinéticas $k_{ij}(V_0)$ no difieren entre ellos por un factor mayor a seis veces, en cambio, los valores de n_{ij} son mucho más disímiles. Los valores de los parámetros de ajuste fueron promediados para describir el comportamiento cinético de un canal de sodio 'tipo'.

A partir de los valores promedios de $k_{ij}(V_0)$ y de n_{ij} del canal 'tipo', se generaron registros simulados a distintos voltajes. A partir de estos registros, se construyeron distribuciones de los tiempos de permanencia que fueron ajustadas con el método de máxima verosimilitud para determinar las constantes de tiempo de las distribuciones. A valores de $V < V_0$, el ajuste de las distribuciones de los tiempos de permanencia en el estado cerrado con tres componentes exponenciales no fue significativamente mejor que con dos componentes (métodos, sección 2.5.2.2). Los resultados de estos ajustes se resumen en la línea continua que aparecen en las figura 3.22 y 3.23. En la figura 3.22 es posible apreciar que las constantes de tiempo del canal 'tipo' siguen razonablemente bien la tendencia indicada por la regresión logarítmica (línea discontinua), por otra parte, en la figura 3.23 se aprecia que la fracción de eventos correspondientes a los componentes τ_{o1} y τ_{o4} es razonablemente bien descrita por la línea continua, en cambio, la curvas del componente τ_{c3} , tiene una forma bimodal que no se aprecia en los datos experimentales. Esta forma bimodal se debe a que a valores de $V < V_0$ el ajuste de las distribuciones de las duraciones del estado cerrado se hace con dos componentes exponenciales, pues el componente τ_{c3} enmascara al componente τ_{c4} , por lo tanto, en el ajuste de estas distribuciones la fracción de eventos de τ_{c3} también incorpora los eventos de τ_{c4} . Con esta salvedad, tanto a valores de $V < V_0$, como a $V > V_0$, la fracción de eventos correspondientes a τ_{c3} decrece con la hiperpolarización, tal como lo muestran los resultados experimentales.

Tabla 3.5

Modelo II: Valores de $k_{ij}(V_0)$ y de n_{ij}

[Na ⁺]	0,2 M	0,2 M	3,0 M	3,0 M	3,0 M	
k_{ij}	Constantes cinéticas					Promedios
k_{12}	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0 ± 0.0
k_{21}	21.4	75.4	24.8	16.0	18.8	31.2 ± 24.8
k_{24}	374.0	397.0	427.0	186.0	170.0	311.0 ± 123.0
k_{42}	170.0	84.8	144.0	66.0	72.7	108.0 ± 46.6
k_{54}	19.9	8.7	13.0	11.0	11.2	13.8 ± 4.2
k_{45}	3.6	8.7	4.2	3.7	3.4	3.4 ± 0.9
k_{43}	11.9	27.8	17.6	5.7	9.6	9.4 ± 5.9
k_{34}	59.1	80.6	49.0	37.4	43.5	53.8 ± 16.7
k_{31}	403.0	59.6	331.0	219.0	193.0	241.0 ± 132.0
k_{13}	127.0	64.0	141.0	57.8	53.2	88.6 ± 41.9
n_{ij}	Valencias efectivas					Promedios
n_{12}	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
n_{21}	3.33	2.20	0.01	0.18	0.85	1.31 ± 1.42
n_{24}	-1.26	-0.31	-0.78	-1.22	-1.36	-0.98 ± 0.44
n_{42}	-0.08	-0.06	1.23	0.70	0.52	0.46 ± 0.55
n_{54}	0.88	1.25	-0.70	-0.78	0.76	0.28 ± 0.95
n_{45}	1.94	-1.74	-2.06	-2.20	0.45	-0.72 ± 1.84
n_{43}	2.32	0.86	0.66	0.46	0.39	0.94 ± 0.79
n_{34}	-1.37	-0.59	-0.57	-1.04	-0.61	-0.84 ± 0.36
n_{31}	0.70	2.87	1.85	1.57	2.03	1.80 ± 0.79
n_{13}	0.12	-0.47	1.05	0.37	0.30	0.27 ± 0.55

Los valores de k_{ij} están expresados en s⁻¹ los valores de las valencias efectivas están dados en cargas electrónicas. Los promedios están expresados con sus respectivas desviaciones típicas.

3.3.9. Características cinéticas de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas.

La figura 3.30A muestra un registro de corriente de un canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas, este registro fue tomado a -80 mV y en presencia de NaCl 200 y 400 mM en los lados interno y externo del canal, respectivamente. De la misma manera que en el registro mostrado en la figura 2.25A, en este trazo se ha marcado con líneas horizontales sobre el registro aquellas zonas donde se presentan cerrados de larga duración acompañados de abiertos breves. Las líneas horizontales que se encuentran bajo el registro señalan aquellas zonas donde se presentan abiertos de larga duración acompañados de cerrados breves. Las zonas donde no se presenta ninguna marca corresponden a cerrados cuya duración es mayor que 200 ms. Nótese la similitud de este registro con el registro de corrientes de la figura 2.25.

En la figura 3.30B, se muestran los resultados del análisis de correlación entre eventos adyacentes, los valores experimentales están indicados por círculos negros, la línea continua corresponde al análisis de correlación de los registros simulados a partir de las constantes cinéticas obtenidas del ajuste de las distribuciones experimentales (Figura 3.31B). En la figura 3.30B, las líneas horizontales continuas y discontinuas corresponden al promedio de todos los eventos abiertos de los registros experimental y simulado, respectivamente.

La figura 3.31A muestra las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado de este canal, en estas distribuciones se aprecian claramente los dos componentes de la distribución de los abiertos y los tres componentes de la distribución de los cerrados. En la figura 3.31B se muestra el ajuste de las distribuciones experimentales con el modelo II. Estos resultados indican que el comportamiento cinético de ambos canales puede ser descrito adecuadamente con el mismo modelo cinético.

Figura 3.29 Propiedades cinéticas del canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas.

A.- Registro de un canal de sodio modificado por BTX en Na^+ proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas. Este registro fue tomado en presencia de NaCl 200 y 400 mM en los lados intra y extracelular, respectivamente. El canal fue registrado a -80 mV y filtrado a 250 Hz (-3 dB). La línea horizontal en el extremo derecho del registro indica la corriente correspondiente al canal cerrado. Las líneas horizontales sobre y bajo el registro fueron trazadas a ojo y representan los sectores en que el canal presentaba eventos 'cerrados largos' adyacentes a eventos 'abiertos cortos' y eventos 'abiertos largos' acompañados por 'cerrados cortos'. Los eventos de cierre con duración mayor que 200 ms no fueron marcados. El valor de P_o para esta canal 0,55.

B.- Análisis de correlación entre eventos abiertos y cerrados adyacentes para el canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas. Los círculos negros corresponden al análisis de correlación aplicado al canal que se muestra en el panel A. La línea continua corresponde al análisis de correlación de registros simulados compuestos por 25.000 eventos. Cada registro fue simulado a partir de las constantes cinéticas obtenidas del ajuste de las distribuciones de la figura 3.30 con el modelo II (métodos, sección 2.5.2.4). Las líneas horizontales continua y discontinua corresponden a los promedios de todos los eventos abiertos de los registros experimental y simulado, respectivamente. Cada uno de los valores experimentales graficados representa el promedio de por lo menos 100 eventos abiertos.

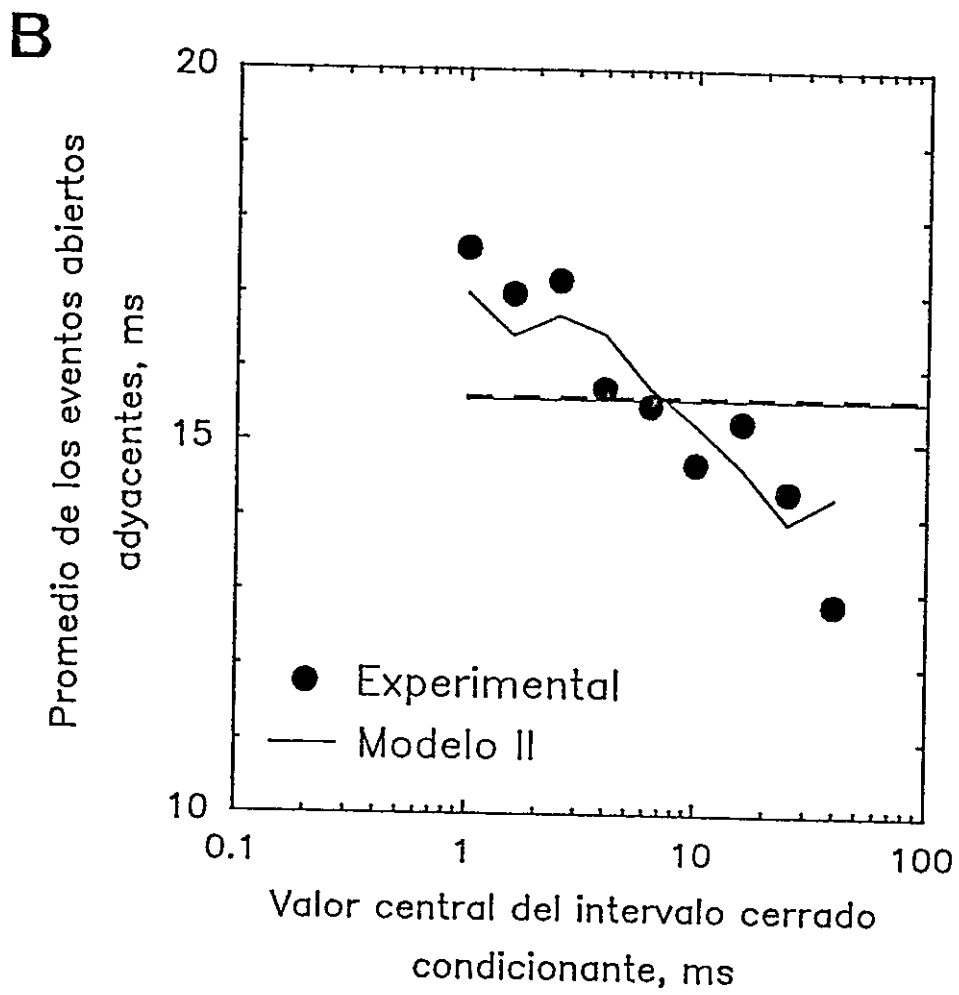
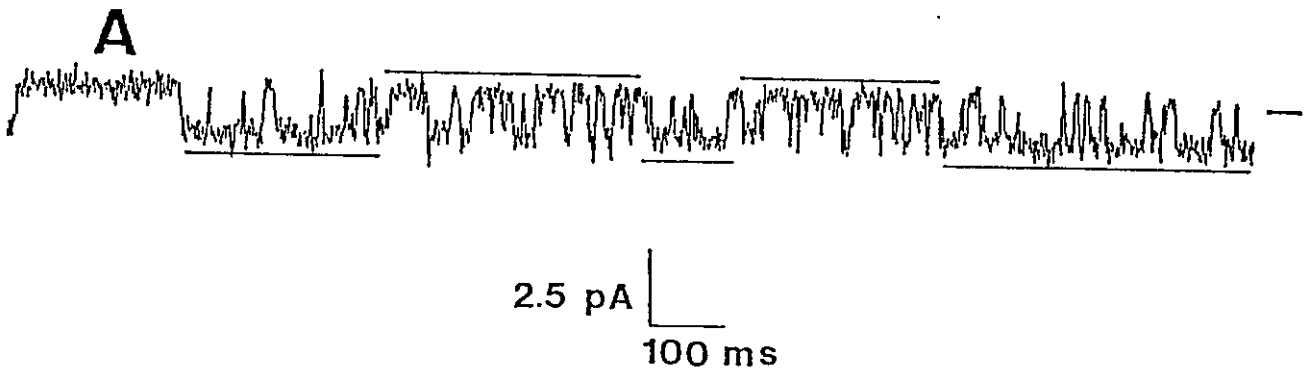
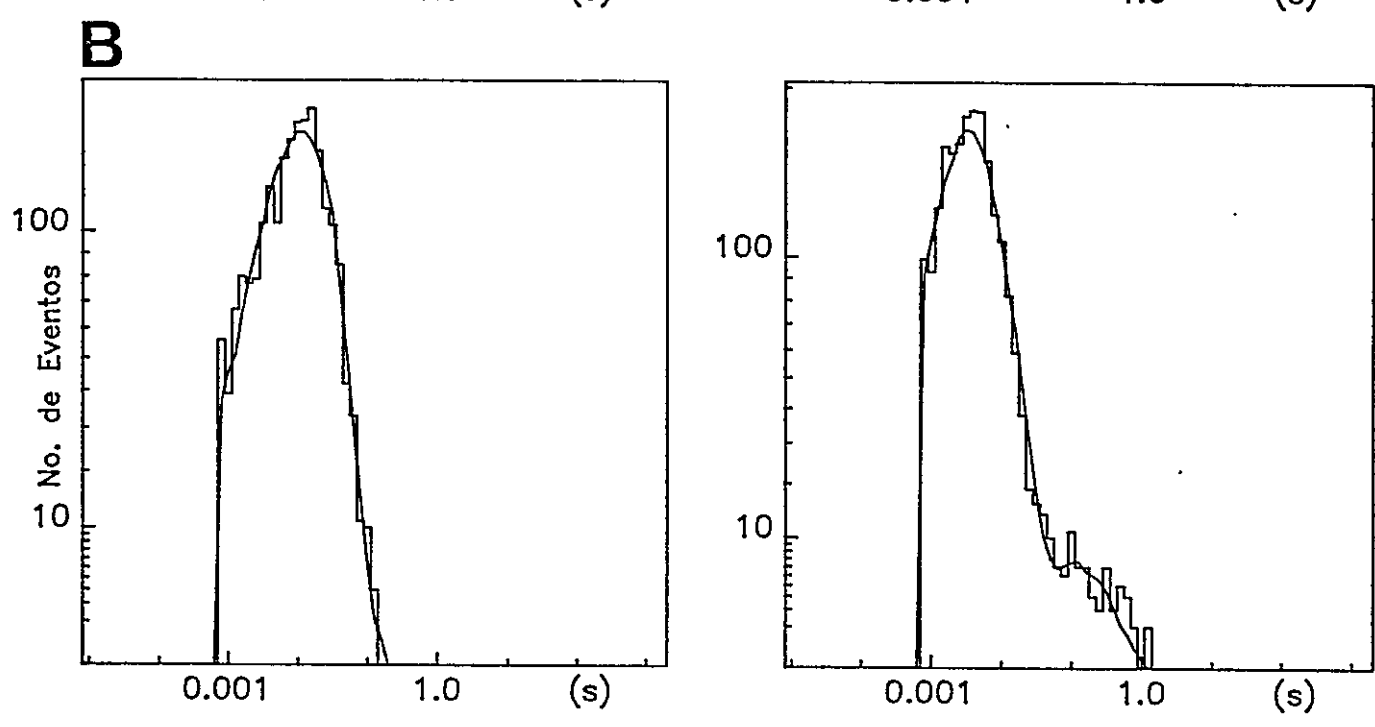
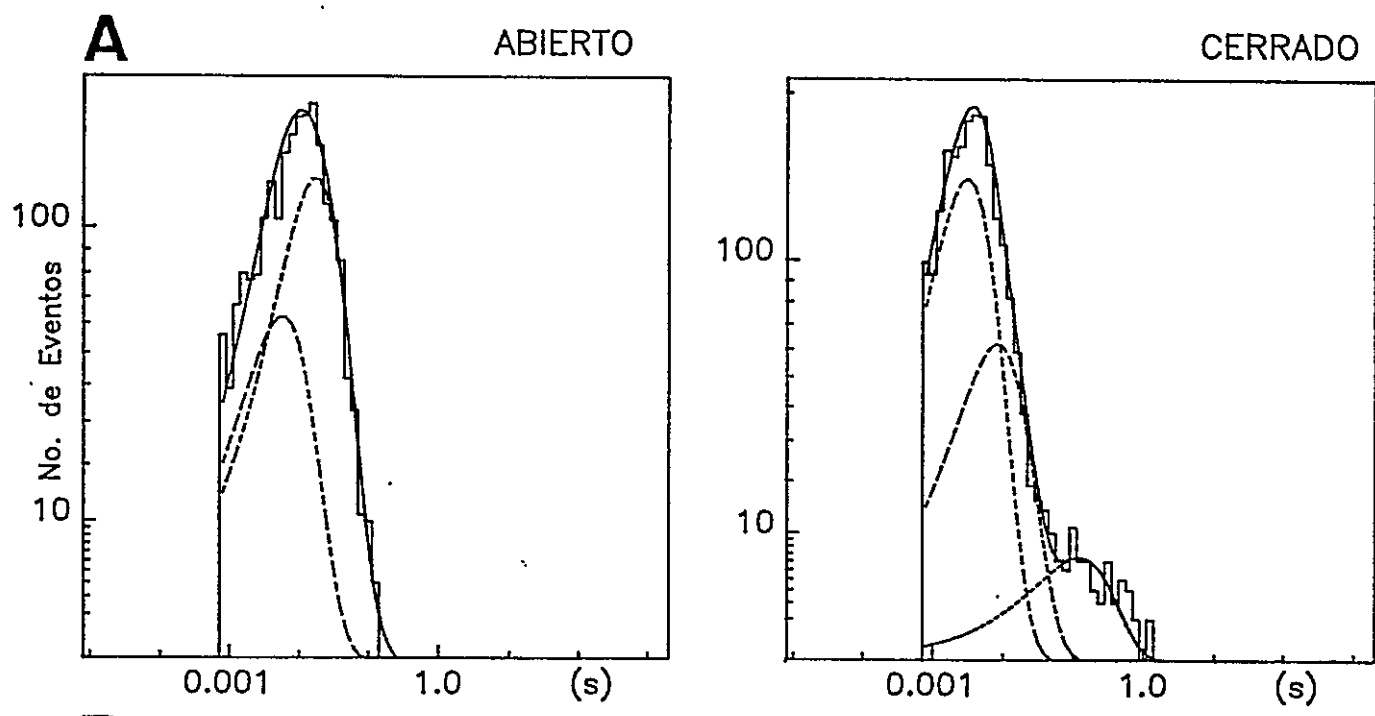


Figura 3.30. Distribuciones de tiempos de permanencia de un canal proveniente de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas.

A.- Distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado obtenidas a partir del canal de la figura 3.29. La línea continua representa el ajuste de máxima verosimilitud de la ecuación 2.16 con dos y tres componentes exponenciales para los eventos abiertos y cerrados, respectivamente. Los valores de las constantes de tiempo para los eventos abiertos son: $\tau_{o1} = 19,76$ ms ($A_1 = 0,66$) y $\tau_{o2} = 6,50$ ms. Las constantes de tiempo para los eventos cerrados son: $\tau_{c3} = 3,50$ ms ($A_3 = 0,68$), $\tau_{c4} = 9,37$ ms ($A_4 = 0,29$) y $\tau_{c5} = 139,00$ ms. 2031 eventos.

B.- Ajuste de máxima verosimilitud a las distribuciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado. La línea continua sobre la distribución experimental corresponde a una distribución generada a partir del modelo II. A partir del modelo II se generó un registro de 10^5 eventos, todos los eventos más breves que $830 \mu\text{s}$ fueron tomados como eventos perdidos y su duración fue sumada a la del evento adyacente (métodos, secciones 2.5.2.5 y 2.5.2.6). Como resultado de este procedimiento, el número de eventos ignorados (eventos perdidos) fue ≈ 30.000 . La distribución generada a partir de los eventos detectados fue puesta a escala con la distribución experimental.



4.- DISCUSION

4.1 Consideraciones en torno a la técnica de bicapas.

En este trabajo se estudiaron la propiedades cinéticas y de conducción iónica del canal de sodio modificado por BTX de los túbulos transversales de músculo esquelético de *Caudiververa caudiververa*. La metodología usada es la única que permite hacer un estudio como el desarrollado en esta tesis:

I.- La incorporación de canales a bicapas planas es una técnica poderosa para estudiar canales que se encuentran en regiones que no son accesibles a microelectrodos. Por ejemplo, en el músculo esquelético se han estudiado canales iónicos provenientes del retículo sarcoplasmático y los túbulos transversales (Coronado y Miller, 1979; Smith y cols., 1985; Suarez-Isla y col., 1988; Vergara, 1983; Latorre y cols., 1982).

II.- Usando la técnica de 'patch clamp' es difícil someter las membrana a concentraciones iónicas extremadamente altas o bajas (como las que se han usado en este trabajo, 0,4-3000 mM) sin deteriorar la calidad del sello. El estudio de la conductancia del canal de sodio que muestra el intervalo de concentraciones más amplio es el trabajo de Green y cols. (1987), en el cual, el intervalo de estudio fue entre 20 y 3500 mM.

III.- En este trabajo se concluye que, tanto la conducción iónica, como las propiedades cinéticas del canal son afectadas por un potencial de superficie generado por cargas negativas en la superficie del canal (secciones 3.2.7.1 y 3.3.4.2). Estas conclusiones son posibles debido a que

los canales fueron incorporados en bicapas formadas por fosfatidiletanolamina, lípido que a pH 7 es neutro (McLaughlin y cols., 1971). En experimentos con canales presentes en su membranas nativas, la interpretación de estos resultados sería más ambigua, ya que, la ubicación física de las cargas que dan origen al potencial de superficie puede ser atribuidas a la membrana plasmática (Correa y cols., 1991).

4.2. Mecanismo de conducción iónica del canal de sodio modificado por BTX.

Con respecto al mecanismo de conducción del canal de sodio del músculo esquelético de *Caudiververa caudiververa*, los resultados mostrados en esta tesis indican que: i.- A bajas concentraciones iónicas, la conducción de iones sodio es afectada por cargas negativas en las superficies internas y externas del canal. ii.- El canal permite ocupación doble. iii.- El canal presenta dos subestados de conductancia (g_{ama_1} y g_{ama_2}), la frecuencia con que se observan uno u otro estado de conductancia está determinada por la concentración iónica y por la presencia de inhibidores de proteasas en el proceso de obtención de membranas.

4.2.1. Efecto de cargas superficiales negativas sobre la conducción iónica del canal.

En esta tesis, los resultados que indican un efecto de cargas negativas de superficie sobre la conducción iónica del canal modificado por BTX son los siguientes:

i.- Cuando la concentración de Na^+ tiende a cero, la conductancia de los dos subestados, g_{ama_1} y g_{ama_2} , tienden asintóticamente a 5,9 y 4,2 pS, respectivamente.

ii.- Cuando la concentración externa de sodio es baja, tanto el bloqueo por Cs^+ , como por Ba^{++} y Mg^{++} no pueden ser descritos por una simple isoterma de inhibición.

4.2.1.1. Comportamiento asintótico de las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$.

Debido a la gran amplitud el intervalo de concentraciones de sodio en que se trabajó, este es el primer trabajo en que se observa esta tendencia asintótica de la conductancia. Este es un resultado importante pues tiene profundas implicaciones con respecto a la geometría de la

distribución de cargas de superficie en el canal.

A falta de información estructural sobre la geometría de la distribución de las cargas de superficie, en esta tesis se aplicó la forma más sencilla de la teoría de Gouy-Chapman. En la derivación de las ecuaciones que relacionan el potencial de superficie con la densidad de cargas, un supuesto fundamental es que las cargas se encuentran distribuidas homogéneamente en una superficie plana infinita (McLaughlin, 1977; Latorre y cols., 1991). Por otra parte, Dani (1986) y Cai y Jordan (1990) han propuesto otras geometrías para la distribución de cargas. Estos autores han propuesto que los extremos del sistema de conducción de los canales iónicos presentan vestíbulos amplios que se hacen más angostos hacia el interior del canal; la etapa limitante en el proceso de conducción iónica se produce en una zona estrecha en que la difusión está restringida. En la frontera entre estas dos regiones existe un anillo de cargas negativas que generan un potencial de superficie que afecta la conducción iónica. A partir de estas dos geometrías de distribución de cargas, en un plano infinito o en un anillo, es posible hacer predicciones completamente distintas sobre el comportamiento de la relación de conductancia vs. $[Na^+]$ en el límite inferior de concentraciones de sodio.

La teoría de Gouy-Chapman predice que cuando la concentración en el seno de la solución tiende a cero, el potencial de superficie tiende a infinito y la concentración local de Na^+ en la superficie cargada tiende a $\sigma^2/(2RT\epsilon_0\epsilon_w)$, en que σ , R , T , ϵ_0 y ϵ_w son la densidad de carga en la superficie del canal, la constante de los gases, la temperatura absoluta, la permitividad del vacío y la constante dieléctrica del agua, respectivamente (Green y cols., 1987a; Cai y Jordan, 1990; Latorre y cols., 1991). Dado que la concentración local tiende a un valor fijo, entonces, en el límite inferior de la concentración iónica, la conductancia del canal también tiende a un valor fijo (ver figura 3.12). Por otra parte, a partir de la solución numérica de la ecuación de Poisson-Boltzmann para la geometría propuesta por Cai y Jordan, la predicción es que la conductancia del canal no tendrá asíntota cuando la concentración de Na^+ en el seno de la solución tienda a cero, pues, en esta geometría, el potencial de superficie tiende a un valor finito y la concentración local de Na^+ tiende a cero (Jordan y cols., 1989; Cai y Jordan, 1990).

Los resultados de la figura 3.12 muestran claramente que la conductancia de ambos subestados del canal, $gama_1$ y $gama_2$, tiende a un valor asintótico cuando la concentración de sodio tiende a cero. Por lo tanto, la suposición inicial de que las cargas negativas se encuentran en un plano parece más razonable que la geometría planteada por Cai y Jordan (1990). Es necesario tener presente que estos resultados no descartan la existencia de un vestíbulo cargado en el sistema de conducción del canal, solo se descarta la geometría de distribución de cargas planteada por Cai y Jordan. Otro argumento en contra de la geometría propuesta por Cai y Jordan es que la estimación de la constante de disociación para el Na^+ hecha a partir de este modelo es extremadamente alta ($K_{ap}=2,5$ M; ver secciones 4.2.2.2 y 4.2.2.3).

4.2.1.2 Bloqueo a bajas concentraciones de Na^+ .

Los resultados que muestra la figura 3.15 se pueden resumir en que una simple isoterma de inhibición no puede dar cuenta de bloqueo de las corrientes por Cs^+ o por cationes divalentes (Ba^{++} y Mg^{++}), en cambio, ellas pueden ser adecuadamente descritas suponiendo que la concentración del ión bloqueador en la vecindad del sitio de bloqueo es incrementada por la existencia de un potencial de superficie (Smith-Maxwell y Begensich, 1987; MacKinnon y cols., 1989; Villarroel, 1989; métodos, ecuaciones 2.7, 2.8 y 2.9).

Para hacer el ajuste de estas curvas se usó la densidad de carga superficial en el lado externo obtenida del modelo de barreras ($\sigma_{ex} = 0,041 \text{ -enm}^{-2}$; tabla 3.2) como parámetro fijo. Con estas condiciones se pudo obtener un buen ajuste al efecto de los cationes divalentes (línea continua en la figura 3.15B), pero, para el Cs^+ el ajuste fue inadecuado (línea discontinua en la figura 3.15A; $K_D = 377$ mM) y el mejor ajuste se obtuvo a partir de una densidad de carga mayor ($\sigma_{ex} = 0,1 \text{ -enm}^{-2}$; $K_D = 733$ mM; línea discontinua en la figura 3.15A).

Sin embargo, la interpretación de los resultados resumidos en la figura 3.15 se complica debido a que el canal permite ocupación múltiple, ya que, en la derivación de la ecuación 2.9 se supone que el ión bloqueador se une a un sitio único en el canal. En consecuencia, los resultados mostrados en la figura 3.15 pueden representar el efecto combinado de la ocupación doble y de

las cargas de superficie.

4.2.1.3 *Potencial de superficie en el mecanismo de conducción de otros canales Na^+ incorporados a bicapas.*

Hasta el momento, con la técnica de bicapas se han estudiado la relación de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ en canales de sodio modificados por BTX de diversos orígenes: los canales de cerebro de rata y de perro (French y cols., 1986b; Green y cols., 1987a), purificado de electroplaca de anguilla (Recio-Pinto y cols., 1987), de músculo esquelético de rata (Moczydlowski y cols., 1984a) y de nervio óptico de calamar (Behrens y cols., 1989). De estos trabajos, solo los canales de cerebro de perro y el canal purificado de anguilla muestran resultados que indican la presencia de cargas de superficie que actúan sobre el sistema de conducción del canal. Esta diversidad podría ser consecuencia de modificaciones de los canales durante el tratamiento bioquímico de obtención de membranas. La diversidad, también puede representar diferencias estructurales entre los canales de cada uno de los orígenes. En tal caso, probablemente las diferencias entre los canales no son resultado de grados distintos de glicosilación, pues, la glicosilación parece afectar más a la cinética de apertura y cierre que al sistema de transporte de iones (ver sección 4.3.2.3).

4.2.2 *El canal de sodio modificado por BTX presenta ocupación múltiple.*

El efecto anómalo de la fracción molar que se muestra en la figura 3.16 no puede ser explicado con ningún modelo de conducción que permita solo un ion a la vez dentro de su sistema de conducción del canal. Por lo tanto, constituye una demostración de que el canal de sodio permite ocupación múltiple (Hagiwara y cols., 1977; Hess y Tsien, 1984; Eisenman y cols., 1986). Este resultado es muy importante puesto que es primera vez que en un canal de sodio modificado por BTX se observa este fenómeno.

4.2.2.1 *El efecto anómalo de la fracción molar y el modelo de barreras.*

El modelo de barreras propuesto para explicar las características de conducción del canal

de sodio modificado por BTX puede dar cuenta de la mayor parte de los resultados experimentales, sin embargo, este modelo no puede dar cuenta del efecto anómalo de la fracción molar en las mezclas de sodio y litio. Con cualquiera de las dos combinaciones de factores de repulsión electrostática usadas ($A_{Li-Li} = A_{Na-Na} = 2.36$ ó $A_{Na-Na} = 2.36$ y $A_{Li-Li} = 1.48$), el modelo de barreras no predice la existencia de un mínimo.

Debido a que las relaciones corriente-voltaje a concentraciones mayores que 10 mM son simétricas en torno al eje del voltaje, el modelo de barreras de energía que se construyó es simétrico con respecto a los extremos de la vía de conducción. Esta condición es claramente errónea, pues, el efecto anómalo de la fracción molar se observa con claridad solamente a potenciales negativos, por lo tanto, este resultado refleja la existencia de un componente asimétrico en el sistema de conducción que no es observable en las condiciones experimentales más simples (resultados, figura 3.11). Sin embargo, para los iones potasio y rubidio esta asimetría del sistema de conducción es claramente observable aún en ausencia de mezclas. En el canal de sodio modificado por BTX del músculo esquelético de rata, las relaciones corriente-voltaje en 200 mM KCl en ambos lados del canal son mayores a potenciales negativos que a potenciales positivos, por otra parte, el potencial de inversión que se obtiene en condiciones biiónicas Na^+/K^+ o Na^+/Rb^+ es diferente dependiendo de si el Na^+ se encuentra en el lado intra o extracelular del canal (Garber, 1988). Es claro que modelos más complejos pueden dar cuenta de los resultados de esta tesis. Estos modelos pueden incorporar más barreras y más sitios de unión (Hille, 1975a) o barreras fluctuantes como las que se han propuesto para el canal-receptor de acetilcolina (Eisenman y Dani, 1986). Sin embargo, la adopción de modelos más complejos requiere mayor número de parámetros ajustables y, por lo tanto, mayor número de datos y condiciones experimentales que las exploradas en este trabajo.

4.2.2.2 Ocupación sencilla en otros canales de sodio modificados por BTX y el problema de las K_{ap} .

Los canales de sodio modificados por BTX en que se ha estudiado la conducción presentan relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ que pueden ser adecuadamente explicadas con

modelos de ocupación sencilla. Los valores obtenidos para la constante de disociación aparente para el Na^+ (K_{ap}) van desde 7 mM hasta 1,5 M (tabla 4.1). Es de interés hacer notar que en los trabajos en que los valores obtenidos de K_{ap} son mayores que 100 mM, los datos no se ajustan con una curva de Michaelis-Menten requiriéndose incorporar la presencia de cargas de superficie como condición necesaria para explicar las relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ sin apartarse de un modelo de ocupación sencilla. Este resultado es sorprendente pues, a menos que el mecanismo de transporte en el interior de los canales cargados sea diferente al sistema de transporte de los canales no cargados, después de corregir por el efecto de las cargas de superficie, se debiera esperar que las constantes de disociación sean similares.

Las diferencias en los valores de K_{ap} encontrados pueden ser explicadas sin necesidad de considerar que el mecanismo de conducción de los canales es diferente.

Las enormes diferencias en los valores de K_{ap} parecen depender estrechamente del intervalo de concentraciones de sodio en que cada estudio fue hecho. En la tabla 4.1 se aprecia que cuando el intervalo de estudio está desplazado hacia concentraciones bajas, los valores obtenidos para K_{ap} son del orden de 10 mM, por otra parte, cuando el intervalo de concentraciones está desplazado hacia concentraciones mayores, los valores de K_{ap} son mayores. En consecuencia, las discrepancias entre los valores de K_{ap} pueden deberse a que el ajuste con modelos de conducción que permiten un solo ión se hizo en diferentes intervalos de concentraciones de sodio.

En este trabajo, la primera indicación de que el canal de Na^+ modificado por BTX puede ser doblemente ocupado fue entregada por el ajuste de las relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ que se muestran en la figura 3.12. La distinción entre el modelo de barreras con ocupación sencilla y con ocupación múltiple a partir de la forma de las relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ fue posible gracias a que la amplitud del intervalo de concentraciones en que se desarrolló este trabajo es mayor que cualquiera de los estudios anteriores.

Por otra parte, los parámetros del modelo de barreras que dan mejor ajuste a las relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ de la figura 3.12, muestran que los valores de densidad de carga

Tabla 4.1

Cuadro comparativo de los valores de K_{ap} , de conductancia máxima (g_{max}) y de densidad de cargas de superficie descritos para otros canales de sodio modificados por BTX.

Canal	K_{ap} (M)	g_{max} (pS)	σ (-enm ⁻²)	Intervalo	Referencia
Cerebro de perro	1,500	45	0,38	0,020-3,50	Green y cols., 1987a.
Axón de calamar	0,214	11	0,26	0,015-1,00	Correa y cols., 1991.
Cerebro de rata	0,037	31	----	0,025-1,00	French y cols., 1986b.
N. óptico de calamar	0,011	23	----	0,005-0,54	Behrens y cols., 1989.
Músculo de rata	0,008	21	----	0,003-0,48	Moczydlowski y cols., 1984a.

El intervalo $[Na^+]$ en el que se estudió la conductancia de estos canales está expresado en concentración molar. En el trabajo de Correa y cols., 1991 el valor K_{ap} , se obtuvo a partir de la profundidad de los pozos de un modelo de barreras de energía que ellos usaron. En el resto de los trabajos, los valores de K_{ap} fueron obtenidos a partir del ajuste de una curva de Michaelis-Menten que relaciona la conductancia del canal con la concentración local. El símbolo ---- indica que en los ajustes, los autores no consideraron la presencia de cargas de superficie.

superficial σ y de energía de los picos y pozos que se obtienen dependen fuertemente de las condiciones de ocupación sencilla o múltiple con que se haga el ajuste (ver resultados, tabla 3.1). Por ejemplo, a partir de la condición de ocupación sencilla, se obtienen valores de energía para los pozos de γ_1 y γ_2 de 0,52 y -0,16 kT, respectivamente, el cálculo de las K_{ap} a partir de estos valores son 1,68 y 0,85 M, respectivamente. Nótese que estos valores son comparables a los valores que se han obtenido para los canales que presentan constantes de disociación altas. En cambio, los valores de K_{ap} que se obtienen cuando el ajuste se hace con la condición de ocupación doble, son considerablemente más bajos. Estos valores son 0,014 y 0,018 M para γ_1 y γ_2 respectivamente; valores parecidos a los obtenidos para los canales que presentan constantes de disociación pequeñas.

4.2.2.3 Los canales modificados por BTX comparten un mecanismo de transporte común.

Las diferencias entre las características de conducción de γ_1 y γ_2 pueden ser explicadas suponiendo un cambio en las barreras de energía en el sistema de conducción del canal. Por esta razón, diferencias en la altura de las barreras de energía podrían explicar las diferentes conductancias que muestran los distintos canales de sodio modificados por BTX (Tabla 4.1). Suponiendo que el mecanismo de transporte en el interior del canal es el mismo (ocupación múltiple) y que los canales solo se diferencian en la amplitud del potencial de superficie que afecta la distribución de iones en la bocas del canal y en la altura de las barreras de energía, las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ de diferentes canales de sodio modificados por BTX fueron ajustadas con el modelo de barreras de la figura 3.14. Estos ajustes fueron hechos dejando como parámetros ajustables la altura de las barreras y la densidad de cargas de superficie; la profundidad de los pozos de energía y el factor de repulsión electrostática se dejaron fijos en -4,25 kT ($K_{ap} = 14,4$ mM) y 2,36 kT, respectivamente (ver resultados, tabla 3.2). Este procedimiento fue aplicado exitosamente con todos los canales, con la excepción del canal de cerebro de rata (French y cols., 1986b). Para este canal, la profundidad de los pozos de energía también fue un parámetro ajustable que alcanzó un valor de -2.91 kT.

Tabla 4.2

Cuadro comparativo de los parámetros de ajuste con el modelo de barreras a las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ de otros canales de sodio modificados por BTX.

Canal	picos kT	K_{ap} mM	σ -e/nm ²	Referencia
C. purificado de anguilla	8,81	14	0,225	Recio-Pinto y cols., 1987.
Cerebro de perro	8,64	14	0,166	Green y cols., 1987a.
Músculo de rana				
<i>gama</i> ₁	8,83	14	0,026	Este trabajo.
<i>gama</i> ₂	9,09	14	0,024	Este trabajo.
Músculo de rata (3-480)	8,59	14	0,014	Moczydlowsky y cols., 1984a.
Cerebro de rata (*)	9,44	55	0,005	French y cols., 1986b.
Nervio óptico de calamar	8,48	14	0,002	Behrens y cols., 1989.
Músculo de rata (0,5-3000)	8,27	11	0,009	Comunic. Pers. Dr. Moczydlowsky

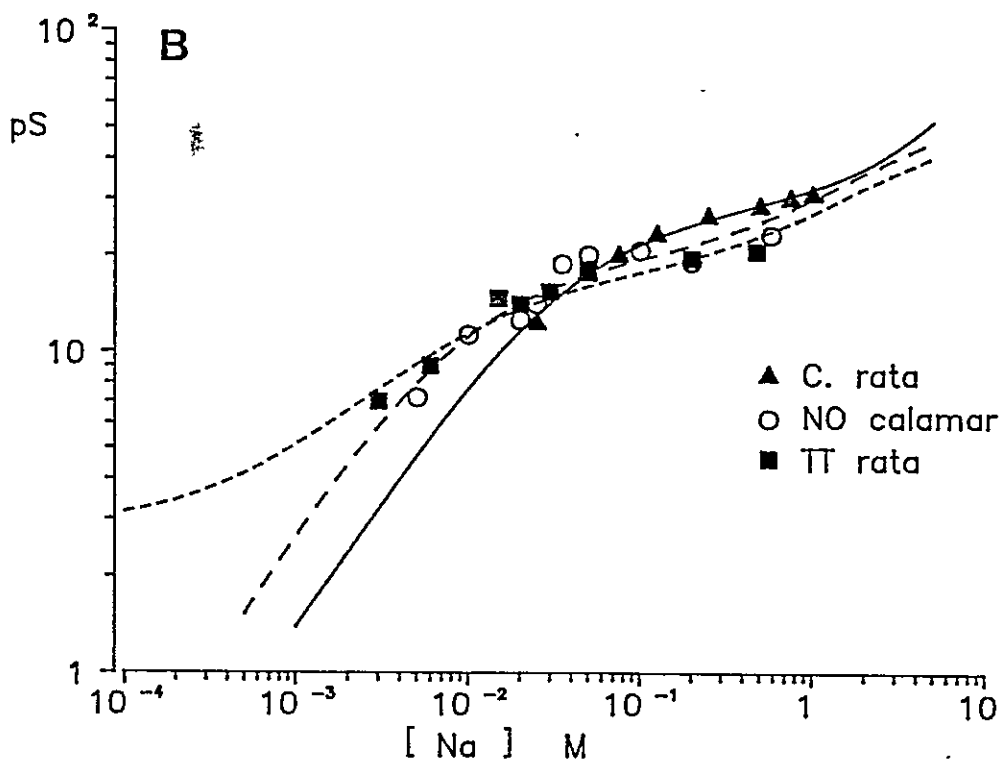
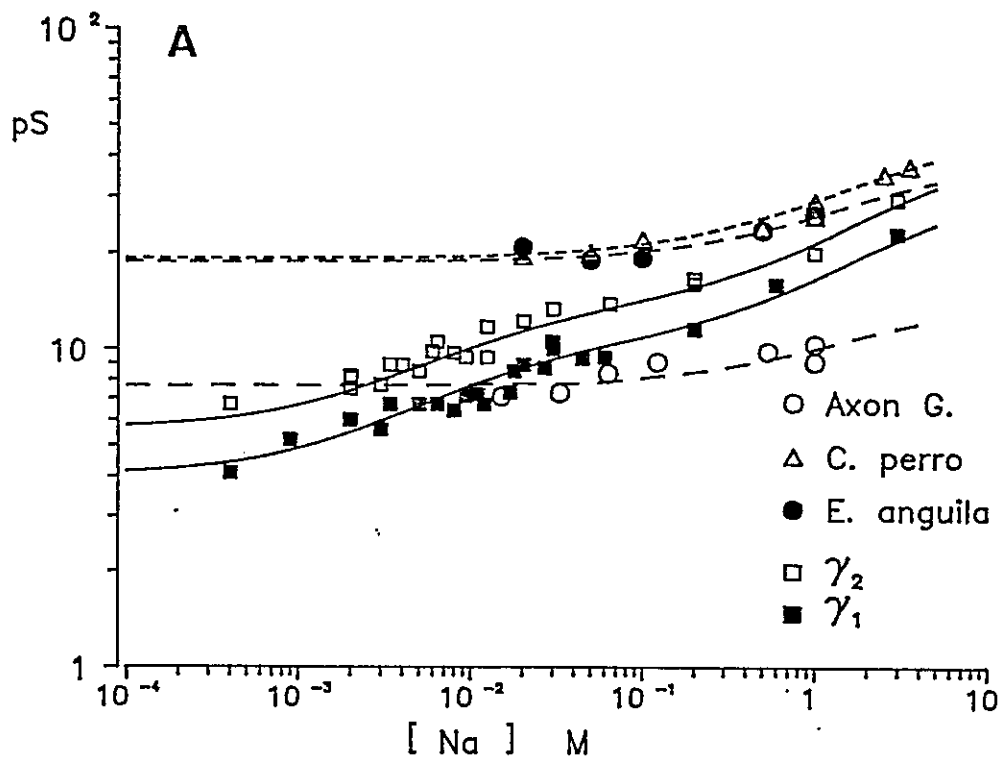
Los valores de energía de los picos están expresados en unidades de kT (usando como referencia 1 molar). Los valores de σ corresponden a la densidad de cargas negativas, que se supone igual, en ambos lados del canal. En todos los ajustes de las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ se fijaron los parámetro de repulsión electrostática ($A_{Na-Na} = 2,36$ kT). La profundidad de los pozos de energía fue fijada en -4.25 kT para todos los ajustes, excepto en el trabajo señalado por (*) en el que fue un parámetro ajustable que convergió a -2.91 kT. En los resultados de músculo de rata en el intervalo 0,5-3000 mM fueron ajustados dejando libres a los cuatro parámetros.

Figura 4.1. Relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ para diferentes canales de Na^+ modificados por BTX.

Las curvas fueron trazadas a partir del modelo de barreras de la figura 3.14 evaluado en el intervalo 0,1-5000 mM. Los parámetros para canal se encuentran en la tabla 4.1, ellos difieren en la densidad de cargas superficial y en la altura de las barreras.

A.- Canales con alta densidad de carga superficial. Las líneas continuas fueron trazadas a partir de los parámetros de la tabla 3.2 y corresponden a a $gama_1$ y $gama_2$. Las líneas de discontinuas representan; trazos largos, axón gigante de calamar; trazos medianos, canal purificado de electroplaca de anguila; trazo corto, sinaptosomas de cerebro de perro. Los valores graficados correspondientes al canal purificado de anguila son tomados de Recio-Pinto y cols. (1987).

B.- Canales con baja densidad de carga superficial. La línea continua corresponde a sinaptosomas de cerebro de rata; línea discontinua de trazos largos corresponde a nervio óptico de calamar y la línea discontinua de trazos cortos corresponde a túbulos transversales de músculo esquelético de rata.



Las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ y sus respectivas curvas de ajuste, evaluadas entre 0,0001 y 5,0 M, se muestran en la figura 4.1. Los canales se agruparon en canales 'cargados' (figura 4.1A, músculo esquelético de rana; $gama_1$ y $gama_2$, sinaptosomas de cerebro de perro, el canal purificado de anguila y el canal de sodio de axón gigante de calamar) y canales con 'poca carga' (figura 4.1B, músculo esquelético de rata, nervio óptico de calamar y sinaptosomas de cerebro de rata). En esta figura es posible apreciar que las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ de los canales modificados por BTX pueden ser adecuadamente descritas con el modelo de barreras de la figura 3.14 dejando solo dos parámetros ajustables para la mayoría de ellos. Además, en todas las curvas de ajuste, especialmente en las curvas de los canales 'no cargados' es posible apreciar un forma bifásica de las relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ predichas.

Estos resultados solo se deben interpretar en el sentido de que el mecanismo de conducción iónica es común para todos los canales de sodio modificados por BTX (ocupación múltiple y cargas negativas en la superficie).

4.2.2.4 Comparación con el canal de sodio modificado por BTX del músculo esquelético de rata.

Una confirmación independiente de que los canales de sodio modificados por BTX poseen un mismo mecanismo de conducción iónica ha sido posible obtenerla gracias a la gentileza del Dr. Edward Mockzydowski, Department of Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven, Conn., quien nos facilitó sus resultados aún no publicados de un estudio de la relación de conductancia vs. $[Na^+]$ de los canales modificados por BTX del músculo esquelético de rata. Este trabajo fue hecho en un intervalo de concentraciones similar al estudiado en esta tesis (0,5-3000 mM). En la figura 4.2 se observa la relación de conductancia vs. $[Na^+]$ de este canal, en estos datos se aprecia claramente la existencia del comportamiento bifásico predicho por el modelo de barreras con ocupación doble para la relación de conductancia vs. $[Na^+]$. La línea discontinua de trazos cortos fue trazada a partir del modelo de barreras de la figura 3.14 con los parámetros de $gama_1$ de la tabla 3.2 y fue puesta a modo de comparación. La línea discontinua de trazo largo corresponde al ajuste de los datos del canal de músculo esquelético de rata en el intervalo

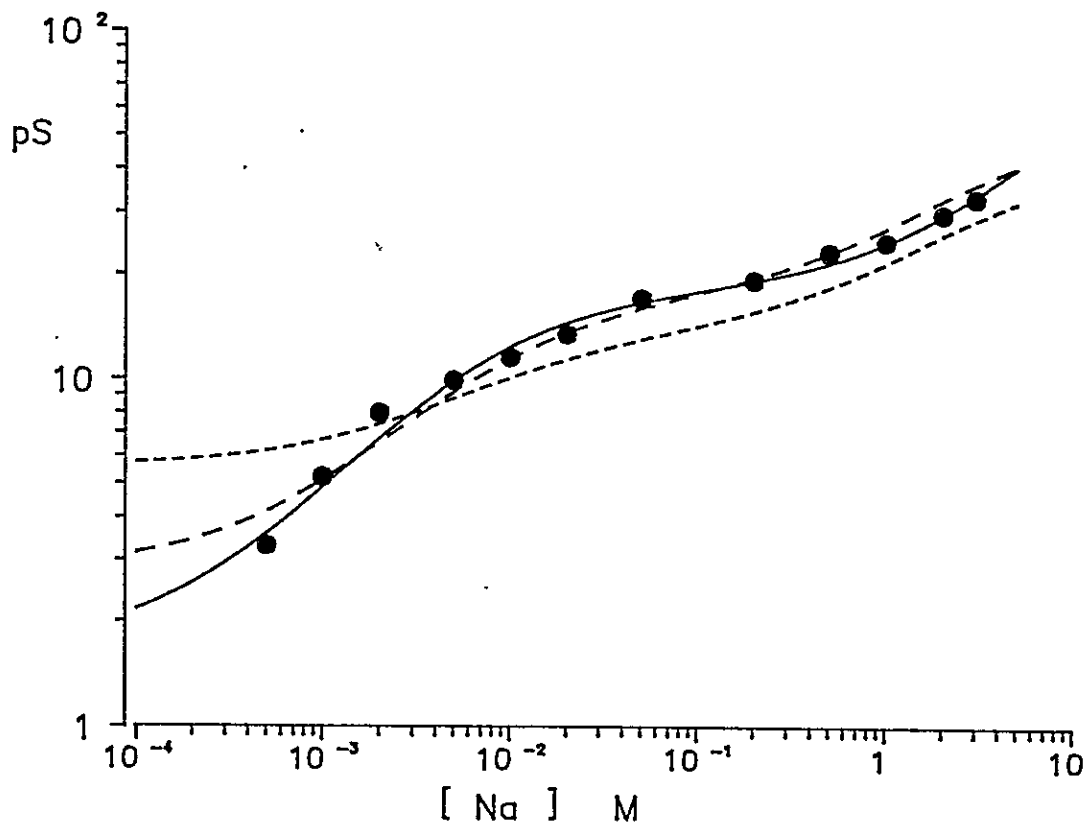


Figura 4.2. Comparación con el canal de músculo esquelético de rata.

La línea discontinua de trazos cortos fue dibujada a partir de los parámetros para g_{Na_1} y fue puesta a modo de comparación. la línea discontinua de trazos fué trazada con los parámetros obtenidos del ajuste de a los datos del canal de sodio de músculo esquelético de Moczydlowski y cols. 1984 (línea discontinua de trazos cortos en la figura 4.1). La línea continua fue trazada con a partir del ajuste a los círculos negros con el modelo de barreras de la figura 3.14, dejando como parámetros libres la altura de las barreras, la profundidad de los pozos, el factor de repulsión electrostática y la densidad de carga superficial. Los valores obtenidos para los parámetros de ajuste a estos datos son: barreras = 8,27 kT; pozos = -4,53 kT; $A_{Na-Na} = 2,92$ kT; $\sigma = 0,0088$ -enm⁻².

estrecho de concentraciones de sodio (3-480 mM) mostrados en la figura 4.1B. Es posible apreciar que el poder predictivo de las condiciones puestas en la sección anterior es razonablemente bueno. La línea continua que sigue con mayor fidelidad a los datos experimentales corresponde al ajuste del modelo de barreras dejando libres los cuatro parámetros ajustables, es decir, la altura de las barreras de energía, la profundidad de los pozos, el factor de repulsión electrostática y la densidad de cargas de superficie. Los parámetros resultantes del ajuste están en la tabla 4.2.

En la figura 4.2, la línea discontinua de trazos largos representa la condición que dentro de la vía de conducción, el mecanismo de transporte es igual al del canal de músculo esquelético de rana (idéntico factor de repulsión electrostática e idénticas constantes de disociación). Por otra parte, la diferencia entre las líneas continuas y discontinua de trazos largos, es mayor que el error experimental en la determinación de las conductancias (especialmente para los valores mayores que 10 pS). Por lo tanto, la diferencia entre los datos experimentales del canal de músculo de rata y la línea discontinua de trazos largos representa diferencias en el mecanismo de transporte dentro del canal entre los canales de rata y rana. Estas diferencias sumadas a la imposibilidad de obtener buenos ajustes de la relación de conductancia vs. $[Na^+]$ del canal de cerebro de rata fijando la profundidad de los pozos de energía en -4.25 kT (sección 4.2.2.3). Revela la existencia de heterogeneidad en el mecanismo de conducción de los canales de sodio modificados por BTX. En todo caso, a la luz del modelo de conducción con ocupación doble, la heterogeneidad de los parámetros de ajuste de diferentes canales, especialmente en los valores de K_{ep} , resulta mucho menor que la heterogeneidad resultante a la luz de modelos con ocupación sencilla (ver Tabla 4.2).

4.2.2.5. Estado de ocupación del canal en función de $[Na^+]$.

La figura 4.3 muestra la probabilidad de encontrar los cuatro estados posibles de ocupación del canal: vacío; solo el sitio externo ocupado; solamente el sitio interno; ambos sitios ocupados simultáneamente. Estas probabilidades fueron calculadas a 0 mV para el intervalo de concentraciones de sodio de 0.1-5000 mM. De la figura 4.3 es posible notar tres características del sistema de conducción del canal de sodio: I.- Debido a la presencia de cargas de superficie, en 0,1

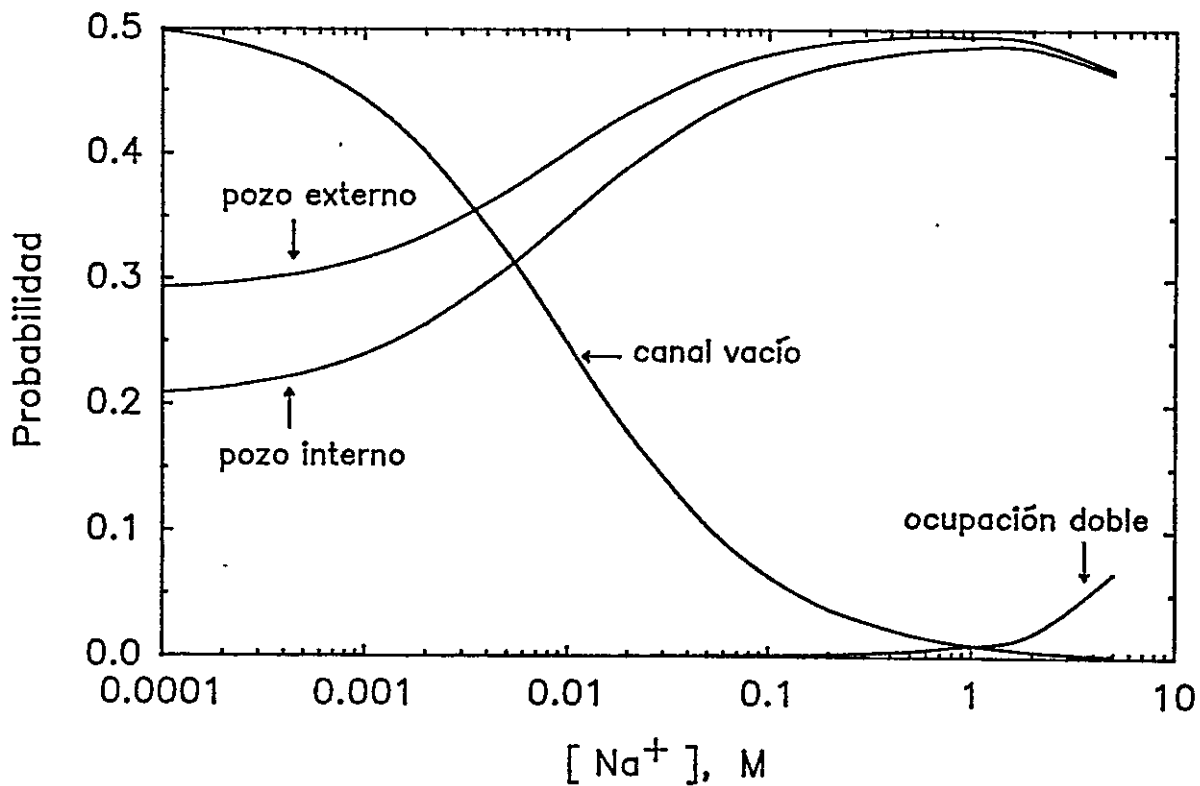


Figura 4.3 Ocupación del canal de sodio en función de $[Na^+]$.

El efecto de aumentar la concentración de sodio en el intervalo 0,1-5000 mM reduce la probabilidad de encontrar el canal vacío desde 0,5 hasta 0, la bajar la concentración de sodio, la probabilidad de encontrar el canal vacío converge a un valor cercano a 0,5. La probabilidad de ocupación del sitio externo es siempre mayor que la probabilidad de ocupación del sitio interno, sin embargo, a concentraciones mayores que 1000 mM la diferencia entre las probabilidades de ocupación de los sitios externo e interno deja de ser importante, por otra parte, a estas concentraciones, la ocupación doble comienza a ser importante.

mM de Na^+ , la probabilidad de encontrar el canal ocupado es 0,5 (en un canal idéntico pero no cargado esta probabilidad es 0,014). ii.- Debido a la mayor densidad de cargas de superficie en el lado externo del canal produce, en todo el intervalo de concentraciones de sodio, la probabilidad de ocupación del sitio externo es mayor que la probabilidad de ocupación de sitio interno. Este resultado podría dar cuenta de la asimetría en el sistema de conducción que se aprecia a partir de la asimetría del efecto anómalo de la fracción molar. iii.- La probabilidad de ocupación doble empieza a ser significativa para concentraciones mayores que 1 M. Este resultado concuerda con la observación que el exponente de la razón de flujos sea igual a uno cuando el canal de sodio del axón gigante de calamar está a concentraciones fisiológicas de sodio (Begenisich y Busath, 1981).

4.2.3 Subestados de conductancia en el canal de sodio.

En esta tesis se ha estudiado el mecanismo de conducción de dos estados de conductancia del canal de sodio modificado por BTX del músculo esquelético de rana (gama_1 y gama_2). Estos estados de conductancia representan dos estados conformacionales de la proteína, cuya estabilización depende de la concentración de sodio y de la presencia de inhibidores de proteasas durante el proceso de obtención de membranas de músculo. Estas dos conductancias son dos formas de la misma proteína, pues, en los canales provenientes de membranas obtenidas, tanto en ausencia, como en presencia de inhibidores de proteasas se observan transiciones entre los dos estado de conductancia (resultados, figuras 3.6 y 3.7). Ambos subestados tienen la misma selectividad iónica (medida entre Li^+/Na^+ y Cs^+/Na^+ ; resultados sección 3.2.4) y sus relaciones de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ son idénticas, excepto por un factor de escala ($\text{gama}_1 \approx 1,5 \text{ gama}_2$; resultados, figura 3.12). Por otra parte, el comportamiento cinético de ambas formas del canal de sodio puede ser descrito con el mismo modelo cinético (resultados, sección 3.3.9). En consecuencia, las diferencias entre estas dos formas del canal pueden ser explicadas por un simple cambio de $\approx 0,40 \text{ kT}$ en la altura de las barreras del sistema de conducción.

4.2.3.1 La frecuencia de aparición de subestados depende de la concentración de Na^+ .

En un amplia variedad de canales iónicos ha sido descrita la presencia de subestados de conductancia (ver Fox, 1987; Meves y Nagy, 1989). En los canales de sodio se ha observado la presencia de subestados, tanto en el canal no modificado (Cachelin y cols., 1983), como en el canal tratado con diferentes toxinas que eliminan o retardan la inactivación (por citar algunos, Green y cols., 1987a; Recio-Pinto y cols., 1987; Patlak, 1988; Nilius y cols., 1989a; Schreiber y cols., 1989; Levinson y cols., 1990).

En esta tesis se muestra que la frecuencia con que se manifiesta los estados de conductancia gama_1 y gama_2 en los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia de inhibidores de proteasas depende de la concentración de sodio. Resultados similares se han encontrado en el canal de cerebro de perro y en el canal purificado de electrolitica de anguila (Green y cols., 1987a; Recio-Pinto y cols., 1987).

Cuando Green y cols., (1987a) estudiaron la relación de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ del canal de sodio de cerebro de perro modificado por BTX, observaron que a concentraciones menores que 500 mM NaCl aparece un subestado de conductancia más ruidoso y con una amplitud que es $\approx 50\%$ de la amplitud del estado principal. La aparición de este estado del canal se hace más frecuente al bajar la concentración de NaCl y a concentraciones menores que 20 mM es el único estado que se presenta. Por otra parte, cuando el canal purificado de anguila es incorporado a bicapas en presencia de BTX y en 500 mM NaCl en ambos lados, presenta una conductancia de 25 pS (Recio-Pinto y cols., 1987), sin embargo, los autores encontraron que infrecuentemente se incorporaban a la bicapa canales con conductancia de 12-14 pS y en soluciones de 20 mM NaCl la frecuencia de aparición de esta conductancia era comparable a la del estado más conductor. En este trabajo, los autores no llegan a determinar si las diferentes conductancias corresponden a dos estados de mismo canal o a dos canales diferentes.

El canal de sodio es una proteína altamente glicosilada, en ella los residuos de ácido siálico son muy abundantes confiriéndole al lado externo del canal una gran densidad de cargas negativas (Miller y cols., 1983; Levinson y cols., 1990; ver sección 4.3.2.2), por lo tanto, cambios en

la fuerza iónica deben generar grandes cambios en los potenciales y campos eléctricos locales que pueden afectar la estabilización de un determinado estado conformacional del canal. Por otra parte, la frecuencia con que se manifiestan los diferentes estados de conductancia depende de la fuerza iónica, entonces, es razonable pensar que la modificación del grado de glicosilación se relacione con la aparición de diferentes estados de conductancia.

En el canal de sodio purificado de electroplaca de anguila, el tratamiento con neuroaminidasa para remover selectivamente residuos de ácido siálico induce la aparición de una gran variedad subestados de conductancia que se intercambian reversiblemente con el estado conductor principal (Levinson y cols., 1990). Por otra parte, la metilación de grupos carboxilos con tetrametiloxonio (TMO) reduce la conductancia del canal en un 37% (Worley y cols., 1986), este efecto se produce de manera 'todo o nada' y se puede interpretar como la inducción de una nueva conformación conductora del canal (*). Por lo tanto, el efecto del TMO y la neuroaminidasa sobre el canal puede ser el de inducir la aparición de estados de conductancia del canal que de otra manera no serían observables (Catterall, 1988).

4.2.3.2 Subestados de conductancia y modelos estructurales de los canales iónicos.

Una amplia variedad de canales presentan subestados de conductancia que son múltiples de una misma amplitud. Por ejemplo, en los canales de Cl^- , el de la electroplaca de *Torpedo*

(*) *El efecto del TMO no solo es reducir la conductancia del canal, sino que también disminuye la sensibilidad al bloqueo por Ca^{++} y evita el bloqueo por STX. El carácter 'todo o nada' de la aparición de todos estos efectos llevo a Worley y cols. (1986) a proponer que la metilación de un solo grupo carboxilo produce todos estos efectos y que este grupo carboxilo se encontraría en la vía de conducción, donde también actuaría la STX. Sin embargo, esta explicación es inconsistente con los resultados encontrados por Moczydlowski y cols. (1984a; 1984b). Ellos encontraron que no se produce competencia entre el Na^+ intracelular y estas toxinas, además, la valencia efectiva del bloqueo por estas toxinas es independiente del número de cargas que posea, por estas razones, el efecto de estas toxinas no sería bloquear la vía de conducción, sino, actuar alostericamente induciendo un cambio conformacional hacia un estado no conductor.*

Por otra parte, una reducción de un 37% en la conductancia del canal no puede ser explicada por una reducción de la densidad de cargas de superficie, pues, a partir de las estimaciones de la densidad de cargas de superficie de este canal (sección 4.1.2.3) y de las condiciones experimentales en que los autores trabajaron, NaCl 125 mM, MgCl_2 100 μM , la influencia de las cargas negativas sobre el sistema de conducción de este canal es tan pequeña que la eliminación de todas las cargas de superficie no debiera reducir la conductancia de este canal en más de un 5%.

presenta dos estados de conductancia de 10 y 20 pS (Miller, 1982); en canal de Cl^- activado por Ca^{++} de neuronas de moluscos se han descrito 16 niveles de conductancia, todos ellos múltiplos de 12,5 pS (Geletyuk y Kazachenko, 1985). Por otra parte, en los canales de K^+ de túbulos renales y de cardiocitos se han observado 4 y 3 niveles de conductancia igualmente espaciados, respectivamente (Hunter y Giebisch, 1987; Matsuda y cols., 1989). Para todos estos canales se ha propuesto una arquitectura común, ellos estarían formados por el agrupamiento de subunidades conductoras idénticas que funcionan en paralelo, entonces, cada subestado de conductancia corresponde a la contribución a la corriente total de una o más subunidades conductoras. En todos estos canales, la frecuencia con que se observan los distintos niveles de conductancia puede ser explicada si cada una de las subunidades se comporta independientemente de la otra. Por otra parte, el canal puede cerrarse completamente desde cualquiera de los niveles de conductancia, lo que indica que además las subunidades pueden actuar coordinadamente para cerrarse. Modelos de este tipo predicen que la selectividad iónica y relación de conductancia vs. la concentración del ion transportado es idéntica en todos los estados posibles de conductancia. Así, en un modelo de barreras de energía las diferencias en la conductancia de los subestados debiera ser descrita como un simple cambio en la altura de las barreras de energía (Fox, 1987).

Dado que las diferencias entre gama_1 y gama_2 pueden ser explicadas por un cambio en la altura de las barreras de energía, este modelo de las subunidades conductoras resulta atractivo para explicar las diferencias observadas entre gama_1 y gama_2 . En efecto, modelos de este tipo han sido propuestos para el canal de sodio (Meves y Nagy, 1989; Schreibmayer y cols., 1989; Schreibmayer, 1990; Schindler, 1990). En todos estos trabajos, los autores coinciden en proponer seis subunidades conductoras para el canal de sodio. Sin embargo, recientemente se ha descrito que un solo ion Cd^{++} puede bloquear completamente el canal de sodio de corazón (Backx y cols., 1990). Los eventos de bloqueo por Cd^{++} se observan como cierres muy breves del canal (cuya duración promedio es ≈ 1 ms) y la constante de rapidez de bloqueo depende del voltaje, indicando que el Cd^{++} penetra en la vía de conducción del canal. Este resultado es incompatible con la hipótesis de las subunidades conductoras puesto que es difícil imaginar que un solo catión pueda

bloquear simultáneamente las seis subunidades conductoras. A pesar de este resultado, aún no es posible descartar el modelo de las subunidades conductoras, puesto que, en el rectificador anómalo, para el cual se ha propuesto una estructura compuesta de tres subunidades conductoras, se ha descrito que los iones Cs^+ y Rb^+ inducen eventos de bloqueo cuya amplitud es $1/3$ de la amplitud máxima, pero que también inducen cierres completos desde la amplitud máxima (Matsuda y cols., 1989).

Otras explicaciones para el origen de subestados de conductancia en los que se preserve las características del mecanismo de conducción iónica (que las diferencias en conductancia puedan ser atribuidas a un cambio en la altura de las barreras de energía), consisten en suponer una compuerta que abre y cierra el canal a una frecuencia tan alta que no puede ser resuelta por el sistema de registro. Este fenómeno produce una aparente reducción de la conductancia, pues, la amplitud de la corriente observada corresponde a un promedio en el tiempo de la corriente que pasa a través del canal (Yellen, 1984 a y b; Blatz y Magleby, 1986b). Si la rapidez de las transiciones es mayor, pero cercana, que la resolución temporal del sistema de registro, producirá un incremento en el ruido eléctrico de la señal cuando el canal se encuentre en este subestado aparente. Esta podría ser una explicación para el subestado que se observa a bajas concentraciones de Na^+ en el canal de sodio modificado por BTX de cerebro de perro (Green y cols., 1987a; ver sección 4.2.3.1). En los canales iónicos, los valores de Q_{10} para los fenómenos cinéticos y de transporte son ≈ 3 y $\approx 1,5$, respectivamente (Hodgkin y cols., 1952). Si el subestado de conductancia es producido por un cambio en el mecanismo de conducción, cuando se modifica la temperatura, no debiera observarse un cambio notable en la razón entre las amplitudes del subestado y del estado principal; en cambio, si el subestado de conductancia es producido por una compuerta que abre y cierra el canal, la razón entre las amplitudes del subestado aparente y el estado principal debiera ser más afectada por la temperatura (Fox, 1987).

4.2.4 Efecto de la BTX sobre el mecanismo de conducción.

En el axón gigante de calamar, la razón de permeabilidades $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}}$ y $P_{\text{NH}_4}/P_{\text{Na}}$ dependen

de la concentración iónica (Meves y Chandler, 1965; Begenisich y Cahalan, 1980a). Estos resultados indican que el mecanismo de conducción del canal de sodio permite ocupación múltiple. Los resultados mostrados en esta tesis indican que esta característica del sistema de conducción se mantiene invariante en el canal modificado por BTX (resultados, sección 3.2.7.2).

Entre los cambios que promueve la BTX sobre el sistema de conducción del canal de sodio, lo más notorio es la reducción de la conductancia unitaria de los canales (Quandt y Narahashi, 1982; Huang y cols., 1984; Correa y cols., 1991). Dependiendo de las condiciones experimentales, la conductancia de los canales modificados se encuentra entre un 40 y 70% de la conductancia de los canales no modificados. Correa y cols. (1991), en el único estudio comparativo del mecanismo de conducción iónica entre canales modificados por BTX y canales no modificados, encontraron que la relación de conductancia vs. $[Na^+]$ de ambos canales es muy similar excepto por un factor de escala. En un modelo de barreras de energía, los parámetros de ajuste de ambas relaciones de conductancia vs. $[Na^+]$ diferían fundamentalmente en la altura de las barreras y no en la profundidad de los pozos de energía. Sugiriendo que, al menos para el ión sodio, la BTX no altera dramáticamente el mecanismo de conducción.

4.2.4.1. Efecto de la BTX sobre la selectividad iónica.

Es ampliamente aceptado que el tratamiento con BTX hace a los canales menos selectivo al Na^+ con respecto a otros cationes, los cambios más dramáticos han sido descritos para el K^+ y el NH_4^+ (Hille, 1984; Khodorov, 1985). Sin embargo, tanto en los canales de sodio modificados por BTX, como en los no modificados, las mediciones de las razones de permeabilidad entre sodio y otros cationes monovalentes que se muestran en la literatura muestran notorias diferencias. Por ejemplo $P_{NH_4^+}/P_{Na^+}$, muestra variaciones entre diferentes preparaciones que se encuentran entre 0,11 y 0,35 (Hille, 1984; Correa y cols., 1991); en el canal modificado por BTX, el intervalo de razones $P_{NH_4^+}/P_{Na^+}$ oscila entre 0,37 y 1,4 (Correa y cols., 1991; Khodorov, 1985). Tales variaciones no son el resultado de la incertidumbre en la medición del potencial de inversión, más bien, ellas representan la conducta bajo diferentes condiciones iónicas de un canal que, modificado o no

modificado, posee un complejo sistema de transporte (mecanismo que permite ocupación múltiple). De hecho, los primeros resultados que sugirieron que el canal permite ocupación múltiple consistieron en observar que la razón de permeabilidades P_K/P_{Na} y P_{NH_4}/P_{Na} dependen de la concentración iónica (Meves y Chandler, 1965; Begenisich y Cahalan, 1980a). En un canal que permite ocupación múltiple, el cambio en la altura de las barreras de energía, como los inducidos por la BTX para el Na^+ (Correa y cols., 1991), puede generar cambios en el estado de ocupación del canal y, como consecuencia de esto, para obtener una misma razón de permeabilidades entre dos iones (por ejemplo: P_K/P_{Na} o P_{NH_4}/P_{Na}) es necesario modificar las condiciones iónicas. En consecuencia, el efecto de la BTX sobre el sistema de conducción podría consistir en un cambio en la altura de las barreras de energía.

4.3 Características cinéticas del canal de sodio modificado por BTX.

Con respecto a las características cinéticas del canal de sodio del músculo esquelético de *Caudiververa caudiververa*, los resultados que se muestran en esta tesis indican que: i.- El canal presenta por lo menos dos estados abiertos y tres estados cerrados. ii.- La cinética del canal es afectada por cambios en la concentración de sodio. Estos resultados pueden ser explicados suponiendo la existencia de cargas negativas en las caras interna y externa del canal. iii.- Existe correlación inversa entre eventos abiertos y cerrados adyacentes. El grado de correlación aumenta a medida que el potencial aplicado se hace más negativo. iv.- El comportamiento cinético del canal puede ser explicado con un modelo cíclico. Este modelo puede explicar el comportamiento cinético de los canales provenientes de las preparaciones hechas en presencia o en ausencia de inhibidores de proteasas.

4.3.1 El canal presenta por lo menos dos estados abiertos y tres estados cerrados.

Hasta este momento, todos los estudios cinéticos de canales de sodio modificados por BTX han reportado la existencia de un sólo estado abierto y por lo menos dos estados cerrados (Quandt y Narahashi, 1982; Huang y cols., 1984; Moczydlowski y cols., 1984; French y cols., 1986;

Behrens y cols., 1989; Keller y cols., 1990). Los resultados mostrados en esta tesis difieren con todos los estudios mencionados anteriormente en que muestran la existencia de al menos dos estado abiertos y tres estados cerrados.

Los 'estados fantasmas' son componentes en exceso que aparecen en las distribuciones de tiempos de permanencia, y son producidos cuando la mayor parte de los eventos son perdidos debido a que la cinética de los canales es más rápida que la resolución temporal del sistema de registro. Las constantes de tiempo de los componentes fantasmas de las distribuciones son menores que el doble del tiempo muerto del sistema de registro (Roux-Sauvie, 1985; MacManus y cols., 1987). Considerando que en la mayoría de los experimentos mostrados en esta tesis el tiempo muerto del sistema de registro fue 0,6 milisegundos, ninguno de los componentes cinéticos encontrados en las distribuciones de los tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado de esta tesis puede ser atribuido a una 'estado fantasma', pues, en este estudio solo se trabajó con componentes exponenciales cuyas constantes de tiempo fueron mayores que 1,2 ms (sección 3.3.3). Por otra parte, la existencia de correlación negativa entre las duraciones de eventos abiertos y cerrados adyacentes (secciones 3.3.5 y 3.3.7.2) es una confirmación independiente de la existencia de más de un estado abierto, ya que, si en el canal existe una sola población de eventos abiertos, todos los eventos cerrados son abandonados hacia la misma población de eventos abiertos y, en consecuencia, no deben presentar ningún tipo de correlación entre la duración de eventos abiertos y cerrados adyacentes.

En todos los trabajos en los que se describe un sólo componente en las distribuciones de eventos abiertos no se han usado criterios estadísticos para determinar si el ajuste de las distribuciones con dos componentes es significativamente mejor. Por otra parte, debido a las características cinéticas del canal, la separación entre los dos componentes exponenciales de las distribuciones es más notoria a potenciales más negativos (figura 3.22). Sin embargo, a estos potenciales la fracción de eventos del componente más lento se hace cada vez menor (f_{o1} en la figura 3.23) haciéndose más difícil su detección.

Tampoco existe en la literatura una discusión basada en criterios estadísticos para

determinar el número de componentes de las distribuciones de eventos cerrados. Además, es posible que la población de eventos cerrados de más larga duración no se encuentre presente en los demás canales, ya que, en todos los trabajos, con la excepción del trabajo de Huang y cols. (1984), el valor máximo que puede alcanzar P_0 (P_{\max}) es muy cercano a 1, en cambio en este trabajo, debido a la presencia de eventos cerrados de larga duración, los valores de P_{\max} fueron cercanos 0,9 (sección 3.1.3).

El canal de sodio de miocitos de corazón tratado con DPI 201-106, un compuesto que retarda la cinética de inactivación en tres ordenes de magnitud, presenta un comportamiento cinético muy similar al encontrado en esta tesis (Nilius y cols., 1989b). En este canal se han encontrado dos y tres componentes exponenciales para las distribuciones de eventos abiertos y cerrados, respectivamente. Aunque la duración del componente más lento (≈ 10 ms) de la distribución de eventos abiertos es poco afectada por el voltaje, la frecuencia con que el canal visita este estado aumenta con la despolarización. La distribución de eventos cerrados solo muestra tres componentes a voltajes más positivos que V_0 (comparar estos resultados con los que se muestran en las figuras 3.22 y 3.23).

4.3.2. La cinética del canal es afectada por el cambio de la concentración de sodio en ambos lados del canal.

En la sección 3.3.2 se describe que el cambio de la concentración de sodio en ambos lados desplaza la curva de activación de los canales, este efecto no es resultado de ningún cambio en el perfil de potencial de los lípidos de la bicapa, puesto que la concentración de Na^+ se cambió simétricamente en ambos lados de la bicapa. Por lo tanto, los resultados obtenidos se deben a un efecto directo del cambio de concentración de sodio sobre el canal y no a través de la modificación del ambiente lipídico.

En el rectificador tardío; en el canal de K^+ activado por Ca^{++} y en el receptor de acetilcolina se ha descrito que la ocupación del sistema de conducción del canal evita o dificulta que el canal se cierre (Armstrong, 1975; Neher y Steinbach, 1978; Miller y Coronado, 1979; Miller y

cols., 1987; Demo y Yellen, 1990). Como resultado del cambio en el estado de ocupación del canal de K^+ activado por Ca^{++} la curva de activación se desplaza en el eje del potencial hacia potenciales más negativos. En los resultados de esta tesis se muestra, que al aumentar la concentración de Na^+ desde 200 mM hasta 3,0 M, la curva de activación se desplaza en $\approx +50$ mV. Si es que existe un efecto del estado de ocupación este no es importante pues el aumento del estado de ocupación del canal debe producir un desplazamiento en sentido negativo (ver sección 4.3.2.3).

4.3.2.1. Origen del desplazamiento de la curva de activación.

Tanto en el nervio como en el músculo, el aumento de la concentración externa de calcio, u otro catión divalente, sube el umbral de excitación (Brink, 1954). Bajar la concentración de calcio tiene un efecto opuesto, hace que los nervios y músculos se hagan hiperexcitables. En 1957, trabajando en el axón gigante de calamar, Frankenhauser y Hodgkin reportaron que el aumento en la concentración externa de calcio desplaza la curva de activación de los canales de sodio y de potasio hacia potenciales más positivos. El efecto del ion calcio sobre la cinética de los canales era como si cambiara la diferencia de potencial a través de la membrana. Ellos propusieron que los iones calcio se adsorben al lado externo de la membrana (que está cargado negativamente) generando un campo eléctrico dentro de la membrana; este campo eléctrico se suma al campo eléctrico aplicado. En esta explicación, las partículas 'sensoras del voltaje' que se encuentran dentro del canal se orientan en un campo eléctrico que puede ser modificado por la concentración de cationes divalentes. Una predicción importante de este modelo (que llamaremos Modelo F&H) es que al cambiar la concentración de cationes divalentes, todos los parámetros que describen el comportamiento cinético de los canales debieran desplazarse de la misma manera en el eje del potencial. Este modelo parece cumplirse en el caso del músculo esquelético de rana. Hahn y Campbell (1983) reportaron que el cambio de la concentración de calcio en el lado externo desplaza en la misma magnitud todos los parámetros cinéticos que dan origen a la corriente macroscópica de sodio, es decir, activación, inactivación, desplazamiento e inmovilización de

cargas.

Sin embargo, en el axón gigante tratado con pronasa (que remueve la inactivación de las corrientes de sodio), Gilly y Armstrong (1982) observaron que el Zn^{++} solo afecta el curso temporal de la activación de las corrientes de sodio ante un pulso despolarizante, en cambio, no afecta el curso temporal de la desactivación al retornar al potencial de mantención. Ellos propusieron que cuando el canal está cerrado expone un grupo cargado negativamente hacia el lado externo, este grupo puede ligar al ion zinc y para que el canal pueda abrirse, el ion zinc debe desligarse del grupo, haciendo más lenta la apertura de los canales. El canal abierto expone este grupo hacia el lado interno, por lo tanto no es afectado por el zinc externo, así la cinética de cierre no es afectada (Modelo G&A).

El desplazamiento de la curva de activación como resultado de cambios en la concentración externa de Ca^{++} también ha sido encontrado en canales tratados con BTX incorporados a bicapas (Cukierman y cols., 1988; Behrens y cols., 1989). Además, en el canal de sodio de cerebro de perro se ha observado que el aumento de la concentración interna de Ca^{++} desplaza la curva de activación hacia potenciales más negativos (French y cols., 1986a; Cukierman y cols., 1988). A la luz de los dos modelos, estos resultados sugieren que la superficie interna del canal también está cargada negativamente (Modelo F&H) ó que en el lado interno también se expone una carga negativa, que puede unir cationes, cuando el canal está abierto (Modelo G&A). Al nivel de canales únicos, para el aumento de la concentración de calcio, ambos modelos hacen dos predicciones. Por ejemplo, al aumentar la concentración externa de calcio:

i.- Los componentes exponenciales de las distribuciones de tiempos de permanencia se desplazan de igual manera en el eje del voltaje hacia potenciales más positivos (Modelo F&A).

ii.- Solo cambian las constantes de tiempo de las distribuciones de tiempos de permanencia en el estado cerrado, ellas se hacen más lentas pues el canal queda atrapado en el estado cerrado (Modelo G&A).

En los trabajos de French y cols. (1986a) y Cukierman y cols. (1988) no se hicieron análisis de las distribuciones de los tiempos de permanencia y por lo tanto, no resolvieron esta controversia.

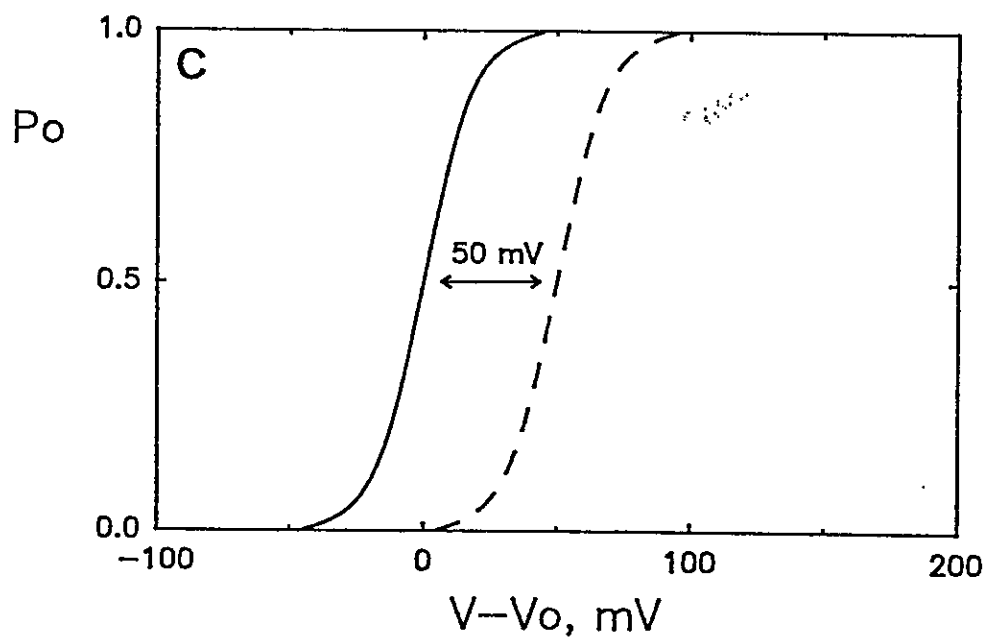
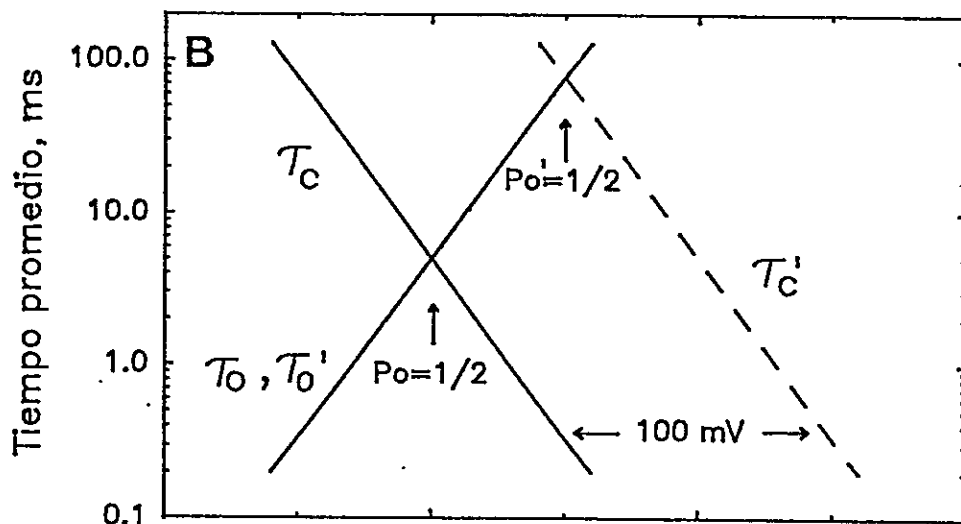
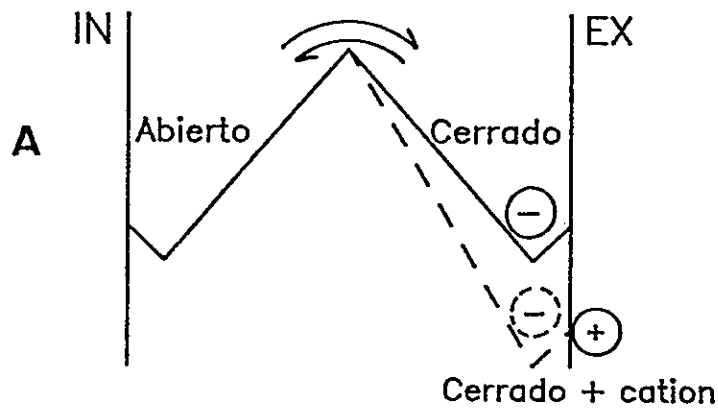
Figura 4.4 Modelo G&A para el desplazamiento de la curva de activación en un canal de dos estados.

A.- Diagrama del efecto de los cationes sobre la energía libre del estado cerrado del canal, cuando el canal se cierra desplaza una carga negativa ($2,8 -e$) hacia el lado externo. La línea continua representa el perfil de energía de la transición entre el estado abierto y cerrado. La presencia de cationes en el lado externo reduce la energía libre del estado cerrado pero no altera el estado energético del estado abierto (en el dibujo, las magnitudes energéticas no están a escala).

B.- Si la energía libre del estado cerrado es reducida en $4 kT$, puesto que a temperatura ambiente $kT/e \approx 25 \text{ mV}$, la relación entre el tiempo promedio cerrado y el voltaje (τ_{o_c} ; línea continua) se desplaza $+100 \text{ mV}$ en el eje del voltaje (τ_{o_c}' ; línea discontinua), en cambio, la duración promedio de los tiempos de permanencia en el estado abierto no se modifica (τ_{o_o} y τ_{o_o}' ocupan los mismos valores). Cuando $\tau_{o_o} = \tau_{o_o}'$ y $\tau_{o_c}' = \tau_{o_c}$, P_o y P_o' serán $1/2$, nótese que P_o' está desplazado $+50 \text{ mV}$ con respecto a P_o .

C.- El desplazamiento de $+100 \text{ mV}$ en la relación entre el tiempo promedio en el estado cerrado y el voltaje, implica un desplazamiento de $+50 \text{ mV}$ en la curva de activación.

En estos cálculos, se supuso que a $V=V_o$, $\tau_{o_o} = \tau_{o_o}' = 5 \text{ ms}$, $n=2,8$ y que los procesos de apertura y cierre tiene la misma valencia efectiva ($n_{ij}=1,4$). Para un desplazamiento de 50 mV en la curva de activación, cuando $P_o' = 1/2$, los tiempos promedio de permanencia en el estado abierto y cerrado son 16 veces mayores.



En los experimentos desarrollados en esta tesis, se limitó con Na^+ el efecto de los cationes divalentes sobre la cinética del canal, como resultado de esto, se observó que el aumento de la concentración de Na^+ desde 0,2 hasta 3,0 M tiene por efecto desplazar la curva de activación en ≈ 50 mV (resultados, sección 3.3.2.2). Después de normalizar el voltaje aplicado con respecto a V_0 , cada una de las constantes de tiempo de las distribuciones de tiempos de permanencia de los experimentos en Na^+ 200 mM y 3,0 M pueden ser razonablemente agrupadas como pertenecientes a poblaciones únicas (resultados, sección 3.3.4.2). Este resultado apoya el modelo F&H, pues, indica que las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado se han desplazado de igual manera en el eje del voltaje.

Además, el modelo G&A predice que al aumentar la concentración de Na^+ en ambos lados del canal, la cinética del canal se hace más lenta pues los estados abierto y cerrado serán estabilizados por la unión de Na^+ a la carga negativa expuesta al lado interno (abierto) como externo (cerrado). Para un desplazamiento de 50 mV en el eje del voltaje, el aumento mínimo esperado para el componente τ_{o3} (cambia e veces por cada 20 mV) es ≈ 10 veces, es decir, según este modelo, cuando $V = V_0$ las constantes de tiempo de las distribuciones de tiempos de permanencia debieran ser, por lo menos, un orden de magnitud más lentas que en 200 mM. La figura 3.22 ilustra claramente que este no es el caso.

Para ejemplificar la observación del párrafo anterior, supongamos una versión más sencilla del modelo G&A; un canal de solo dos estados (un estado abierto y uno cerrado). Cuando el canal está cerrado expone una carga negativa hacia el lado externo (ver figura 4.4A), cuando el canal se abre, la carga negativa desaparece de la cara externa del canal. Al aumentar la concentración de cationes, se hace más probable que la carga negativa expuesta pueda ligar cationes externos, esta situación da como resultado una disminución de la energía libre de la conformación cerrada del canal (línea discontinua) y, por lo tanto, el tiempo promedio de permanencia en el estado cerrado (a un potencial dado) aumentará (figura 4.4B; $\tau_{o'}$ y línea discontinua). El tiempo promedio de permanencia en el estado cerrado no es modificado pues la energía libre del estado abierto no es afectada por el cambio de concentración de cationes ($\tau_{o} = \tau_{o'}$). Como resultado de esto, la

curva de activación se desplazara hacia la derecha (figura 4.4C, línea discontinua), pero, nótese que en esta nueva condición, cuando P_o es $1/2$, los tiempos de permanencia en los estado abierto y cerrado serán mayores (P_o' en la figura 4.4B).

En este modelo, sí la carga también fuera estabilizada desde el lado interno del canal, la diferencia entre los tiempos promedios de permanencia sería aún mayor. Este razonamiento permite suponer que, si el modelo G&A es válido para el canal de sodio modificado por BTX, con respecto al cambio de concentración de sodio, su contribución al desplazamiento de la curva de activación es despreciable. El sitio aniónico propuesto por Gilly y Armstrong (1982) probablemente puede unir Zn^{++} pero no Na^+ .

Estos resultados son completamente concordantes con el efecto del calcio en las corrientes macroscópicas del músculo esquelético de rana (Hahn y Campbell, 1983). En el músculo esquelético, el aumento en 20 veces de la concentración externa de calcio desplaza en 30 mV la curva de activación, de inactivación, la cinética de apertura y de cierre y el desplazamiento de cargas. Además, resultados similares a estos se han observado en canales de nervio óptico de calamar incorporado bicapas en presencia de BTX. Behrens y cols. (1989), estudiando el efecto del calcio externo sobre la cinética de los canales de sodio, hicieron análisis de las distribuciones de tiempos de permanencia y encontraron que el calcio externo desplaza de la misma manera, en el eje del voltaje, los promedios de permanencia en los estados abierto y cerrado.

4.3.2.2 La superficie externa está más cargada que la superficie interna.

4.3.2.2.1 Cálculo de la densidad de carga en la superficie interna del canal.

En este trabajo se muestra que la curva de activación se desplaza hacia potenciales menos negativos cuando la concentración interna de sodio es reducida sin alterar la concentración externa (resultados, sección 3.3.2.1). Para una reducción de $[Na^+]$ desde 200 a 2 mM, la curva de activación se desplaza $\approx +60$ mV. Suponiendo que estos 60 mV se deben a un cambio en el potencial de superficie en el lado interno causado por el cambio en la concentración de sodio (Latorre y cols., 1991), es posible estimar la densidad de cargas negativas en la superficie interna

que afectan la maquinaria cinética del canal, σ_{in} , a partir de la ecuación 2.8 (métodos, sección 2.5.1.3.2).

La diferencia en el potencial de superficie producida por un cambio en la concentración de Na^+ desde C_1 a C_2 , ($\phi_2 - \phi_1$), es:

$$\phi_2 - \phi_1 = 50 [\sinh^{-1}(-1,36\sigma_{in} / \sqrt{C_1}) - \sinh^{-1}(-1,36\sigma_{in} / \sqrt{C_2})], \quad (4.1)$$

en que ϕ_2 y ϕ_1 son los valores del potencial de superficie en el lado interno del canal cuando la concentración de sodio es C_1 y C_2 , respectivamente, σ es la densidad de carga superficial (en $e \text{ nm}^{-2}$). Los valores de ϕ_2 y ϕ_1 son desconocidos, así que sólo conocemos la diferencia (60 mV). Si $C_1 = 0,002 \text{ M}$ y $C_2 = 0,2 \text{ M}$, los argumentos de la función hiperbólica difieren por un factor de 10 (pues $\sqrt{C_2} = 10\sqrt{C_1}$). Haciendo uso de la identidad $\sinh^{-1} x = \ln [x + (x^2 + 1)^{1/2}]$ es posible obtener el valor de σ_{in} solucionando la siguiente ecuación:

$$\exp(60/50) = 3,32 = [X + (X^2 + 1)^{1/2}] / [10X + ((10X)^2 + 1)^{1/2}], \quad (4.2)$$

en que $X = 1,36\sigma_{in}/\sqrt{C_1} = 3,04\sigma_{in} \text{ nm}^{-2}$. La ecuación 4.2 fue solucionada numericamente y se obtuvo una sola solución, esta solución entrega un valor de $\sigma_{in} = 0,062 \text{ -enm}^{-2}$, este valor es aproximadamente tres veces mayor que el valor obtenido a partir del ajuste de las relaciones corriente voltaje con el modelo de barreras (tabla 3.2). A partir del valor de σ_{in} y aplicando la ecuación 2.8, se obtiene una estimación del potencial de superficie en la cara interna del canal cuando la concentración de Na^+ en el lado interno del canal es 200 mM (ϕ_{in}) es de -9,6 mV.

4.3.2.2.2 Cálculo de la densidad de carga en la superficie externa del canal.

Si las dos caras del canal estuvieran igualmente cargadas, entonces, al cambiar simétricamente la concentración iónica en ambos lados del canal, no se espera un corrimiento de la curva de activación en el eje del voltaje, pues, el efecto de enmascaramiento de cargas debiera ser el mismo para ambas caras del canal. Por otra parte, si la densidad de cargas negativas es mayor en la cara externa del canal, al aumentar la concentración iónica, la curva se desplazará hacia potenciales positivos; este ha sido un resultado de este trabajo. Un resultado similar ha sido encontrado por Cukierman y cols. (1988), ellos observan un desplazamiento de la curva de

activación en dirección positiva al aumentar $[Ca^{++}]$ de la misma manera en ambos lados del canal.

Los resultados que se muestran en la figura 3.19, indican que al cambiar la concentración de Na^+ desde 200 mM hasta 3,0 M, la curva de activación de los canales se desplaza $\approx +50$ mV. Además, en la figura 3.19 no es posible observar que exista un desplazamiento en las curvas de activación entre 1,0 (círculos blancos) y en 3,0 M de NaCl (asteriscos). Por otra parte, la relación entre el potencial de superficie y la concentración de Na^+ (ecuación 2.8) predice que ϕ_o tiene una asíntota en 0 cuando la concentración de sodio es muy grande, es decir, a altas concentraciones de sodio el potencial de superficie cambia muy poco. Por lo tanto, a altas concentraciones de sodio, la diferencia entre el potencial de superficie interno y externo ($\phi_{in} - \phi_{ex}$) tiende a cero.

Como primera aproximación, para determinar la densidad de carga en la superficie externa del canal (σ_{ex}), supongamos que en $[Na^+] = 3,0$ M $\phi_{in} - \phi_{ex} = 0$ (puesto que entre 1,0 M y 3,0 M no se produce un desplazamiento en la curva de activación), si esto es cierto, entonces, cuando $[Na^+] = 0,2$ M, $\phi_{in} - \phi_{ex} = -50$ mV. Puesto que en Na^+ 200 mM en el lado interno $\phi_{in} = -9,6$ mV, entonces, en Na^+ 200 mM en el lado externo del canal $\phi_{ex} = -59,6$ mV. Aplicando la ecuación 2.8 obtenemos un valor para $\sigma_{ex} = 0,48$ -enm⁻², este valor es 12 veces mayor que el valor obtenido para σ_{ex} mediante el ajuste de las relaciones corriente-voltaje con el modelo de barreras (tabla 3.2).

4.3.2.2.3 Las densidades de carga superficial calculadas pueden estar subestimadas.

En el canal de sodio modificado por BTX de cerebro de perro incorporado a bicapas de lípidos neutros, el desplazamiento en el eje del potencial producidos por la adición de Ca^{++} 7,5 mM en los lados interno y externo son, -7,3 y +17,2 mV, respectivamente (Cukierman y cols., 1988). Solucionando numericamente la ecuación 2.10 (métodos, sección 2.5.1.4) y a partir de los valores de σ_{in} y σ_{ex} obtenidos en este trabajo, los valores predichos para el efecto del Ca^{++} son -0,8 y +9,3 mV, respectivamente. Es decir, en el canal de cerebro de perro, probablemente la densidad de carga superficial es aún mayor. Algo similar sucede con el canal de sodio modificado por BTX del nervio óptico de calamar. En Na^+ 200 mM, la adición de 10 mM de Ca^{++} en el lado externo

produce un desplazamiento de +15 mV en la curva de activación (Behrens y cols., 1989). A partir de la solución numérica de la ecuación 2.10 y con $\sigma_{ex} = 0,48 -enm^{-2}$, el desplazamiento predicho es de +8,0 mV.

Los cálculos anteriores indican que los valores obtenidos para las densidades de carga superficial interna y externa están subestimadas. Los orígenes de esta subestimación pueden ser tres: i.- El aumento de el estado de ocupación con el aumento de la concentración de Na^{+} produce un efecto contrario en la cinética del canal reduciendo el desplazamiento de la curva de activación (ver sección 4.3.2.1). ii.- En el canal de sodio del músculo de rana la densidad de cargas de superficie en la cercanía de la maquinaria cinética es menor que en los canales de cerebro de rata y de nervio óptico de calamar. iii.- En los canales de sodio de cerebro de perro y de nervio óptico de calamar, la modificación del potencial de superficie por el Ca^{++} es mayor que la predicha por la teoría de Gouy-Chapman, indicando que el Ca^{++} no solo produce enmascaramiento de las cargas, sino, que también puede unirse a ellas formando una capa de iones adsorbidos a la superficie cargada (Por ejemplo: Hille y cols., 1975; Latorre y cols., 1991).

Por otra parte, estudios bioquímicos indican que el canal de sodio es una proteína altamente glicosilada (Miller y cols., 1983; Levinson y cols., 1990). El número estimado de cargas negativas adicionadas al canal de electroplaca de anguila por intermedio de glicosilación es ≈ 110 , estas cargas estarían presentes sólo en el lado externo del canal, además, el radio de Stokes del canal de electroplaca es de 9,5 nm (Agnew y cols., 1978). Supongamos que el canal es un cilindro con igual diámetro y altura colocado longitudinalmente atravesando la membrana, además, que las cargas negativas se encuentran distribuidas uniformemente en la superficie externa, entonces, a partir del número estimado de cargas y del radio de Stokes de la proteína se obtiene un valor de $\sigma_{ex} = 0,39 -enm^{-2}$. Este valor es comparable, pero menor, al estimado a partir del desplazamiento de la curva de activación en función de la concentración de sodio. Si este valor de densidad de cargas en el lado externo es válido para todos los canales, los valores mayores estimados a partir de los cálculos anteriores podrían indicar que la densidad de carga está distribuida de manera diferente en diferentes regiones de la superficie externa del canal, específicamente, en la cercanía de la

maquinaria cinética del canal, la densidad de cargas es mayor que en el resto de la superficie del canal.

4.3.2.3 ¿El potencial de superficie que modula la conducción iónica es generado por las mismas cargas que modulan la cinética?

En el trabajo de Behrens y cols. (1989) se concluye que el potencial de superficie en el lado externo del canal modula la cinética. A partir de los cálculos de la sección 4.3.2.2.3 es posible decir que la densidad de carga en la superficie externa del canal de nervio óptico de calamar es mayor que $0,48 \text{ -enm}^{-2}$. Sin embargo, a diferencia de los resultados de esta tesis (figuras 3.11, 3.12 y 3.15), en el trabajo de estos autores la relación de conductancia vs. $[\text{Na}^+]$ que ellos obtienen no indica una presencia significativa de cargas superficiales (ver sección 4.2.2.3). Para que el efecto de las cargas de superficie sea posible sobre la cinética pero no sobre el sistema de conducción iónica, ambos sistemas deben estar muy separados dentro del canal. Este es probablemente el caso para el canal de sodio de nervio óptico.

A partir de las estimaciones de los potenciales de superficie a 200 mM de sodio calculados para el sistema de conducción y para la cinética, es posible estimar una distancia mínima de separación entre ambos sistemas, para esto aplicamos la ecuación que relaciona el potencial con la distancia a la superficie cargada (Latorre y cols., 1991):

$$\phi(x) = \phi_0 \exp(-kx),$$

en que ϕ_0 es el potencial en la superficie cargada, ϕ es el potencial a la distancia x , a valor $1/k$ se le llama constante de espacio y se obtiene a partir de $k^2 = 2F^2 [\text{Na}^+]/RT\epsilon_0\epsilon_w$, en que F , R y T tienen sus significados usuales, ϵ_0 es la constante de permitividad del vacío y ϵ_w es la constante dieléctrica del agua (En $[\text{NaCl}] = 200 \text{ mM}$ y para valores del potencial de superficie menores que 100 mV, esta ecuación es razonablemente válida). Haciendo los cálculos para los potenciales superficiales internos y externos que actúan sobre la conducción iónica en 200 mM Na^+ y a partir de las estimaciones de la sección 4.3.2.2, se obtiene que las distancias mínimas que separan al sistema de conducción y la maquinaria de compuertas son 0,7 y 1,5 nm para los lados interno y

externo respectivamente.

4.3.2.4 La cinética de apertura y cierre parece ser independiente del estado de ocupación del canal.

En los experimentos que se muestran en esta tesis, al cambiar la concentración de Na^+ en ambos lados del canal desde 200 mM a 3,0 M, la probabilidad de encontrar el canal ocupado crece menos de un 15% (sección 4.2.2.3), en consecuencia, el efecto que este cambio en la ocupación del canal puede ejercer sobre la cinética de apertura y cierre es despreciable (sección 4.3.2).

En el músculo esquelético de rana, el efecto del ión calcio sobre la cinética es independiente de la concentración de sodio, esto se ve reflejado en que en los experimentos de Hahn y Campbell (1983), tanto los parámetros cinéticos de la corriente macroscópica de sodio (en presencia de Na^+ 60 mM externo), como de las corrientes de desplazamiento (Na^+ externo reemplazado por TEA 60 mM) se desplazan en la misma cantidad en el eje del voltaje. Si para canal ocupado es más difícil cerrarse (Neher y Steinbach, 1978; Miller y cols., 1987; Demo y Yellen, 1990), entonces, el efecto del calcio externo debiera ser mayor sobre las corrientes de desplazamiento que sobre las corrientes macroscópicas, pues las primeras son obtenidas en ausencia de Na^+ y en estas condiciones, para el canal sería más fácil cerrarse que en presencia de Na^+ .

Además, en canales incorporados a bicapas de lípidos, se ha descrito que el ion calcio bloquea al canal de sodio desde el lado externo en forma dependiente del voltaje, este bloqueo se observa como una reducción de la corriente que se hace más notoria a potenciales más negativos (por citar algunos, Hille, 1984; French y cols., 1986a; Cukierman y cols., 1988; Behrens y cols., 1989). En los experimentos de Behrens y cols. (1989), el efecto del calcio, no solo es desplazar la curva de activación, sino que también reduce la amplitud de la corriente a menos de la mitad que la condición control, esto significa que el canal permanece más tiempo ocupado por Ca^{++} que por Na^+ y probablemente permanece en total más tiempo ocupado que en la condición control. Aún en estas condiciones Behrens y cols. (1989) pueden describir el desplazamiento de la curva de activación como un efecto de modificar el potencial de superficie.

A partir de estos resultados, es conveniente proponer que:

i.- A diferencia del receptor de acetilcolina y de los canales de K^+ del retículo sarcoplasmático y de K^+ activado por Ca^{++} de los túbulos transversales (Neher y Steinbach, 1978; Miller y cols., 1987; Demo y Yellen, 1990), el canal de sodio de músculo esquelético se puede cerrar independientemente de si se encuentra o no ocupado. Esta proposición es apoyada por la observación de que los anestésicos locales se unen al canal de sodio abierto, pero que la cinética de apertura y cierre es independiente si el canal está o no bloqueado (Strichartz, 1973; Hille, 1984).

ii.- El efecto del potencial de superficie sobre la cinética es mucho mayor y por lo tanto enmascara completamente el efecto de la ocupación. Esta última hipótesis no puede ser completamente descartada, pues, a partir de los cálculos de densidades de carga superficial interna y externa de la sección anterior, es posible predecir un desplazamiento en la curva de activación de $\approx +10$ mV cuando la concentración de sodio es aumentada desde 1,0 hasta 3,0 M, sin embargo, no se observa ningún desplazamiento (figura 3.19). Este efecto puede deberse a los efectos contrarios que tienen el cambio en la ocupación del canal y el cambio de la diferencia del potencial de superficie.

4.3.3. Correlación Inversa entre las duraciones de los eventos abiertos y cerrados adyacentes.

Para hacer una descripción detallada de la cinética del canal de sodio modificado por BTX, junto con determinar el número de estados cinéticos del canal, es necesario establecer las vías de conexión entre ellos. Para obtener esta información es necesario considerar la historia del registro de corrientes, es decir, la secuencia de eventos de apertura y cierre. La aproximación al estudio de la historia del registro que se ha usado en este trabajo consiste en estudiar la presencia de correlación entre eventos abiertos y cerrados adyacentes.

En este trabajo se ha establecido que existe correlación inversa entre las duraciones de los eventos abiertos y cerrados adyacentes, es decir, los eventos abiertos de larga duración son acompañados por eventos cerrados de breves y viceversa, además, el grado de correlación inversa encontrada es más pronunciado a potenciales más negativos (cuando P_o es cercano a

cero). A pesar de que el grado de correlación varía de canal a canal, este resultado fue encontrado sistemáticamente en los siete canales estudiados. Existen dos fuentes de artefactos experimentales que pueden dar como resultado esta clase de correlación:

i.- Cambios de marcha de la actividad del canal. Cambios espontáneos de la probabilidad de encontrar el canal abierto durante el tiempo de análisis pueden producir correlación inversa entre eventos abiertos y cerrados adyacentes. Por ejemplo, si un canal con $P_o \approx 1$ (eventos abiertos de larga duración acompañados de eventos cerrados breves) sufre un cambio de marcha a $P_o \approx 0$ (eventos cerrados de larga duración acompañados de eventos abiertos breves), producirá un cuadro de correlación inversa entre eventos adyacentes. Esta fuente de artefactos puede ser descartada, pues los canales que fueron estudiados sistemáticamente fueron previamente sometidos al examen de estabilidad (sección 3.3.1). Para ejemplificar que registros estables en el tiempo dan origen a correlación inversa, tomemos el caso del canal cuyo análisis de correlación se muestra en la figura 3.24, el examen de estabilidad (a los mismos potenciales) de este canal se muestra en la figura 3.17, estos resultados indican que durante el análisis el canal se comportó como en régimen estacionario y que además presentó correlación inversa entre eventos adyacentes.

ii.- El ruido eléctrico de la señal que cruza el umbral de detección entre el estado abierto y el estado cerrado genera un exceso de eventos breves que interrumpen los eventos más largos. Esta fuente de artefactos puede ser descartada, pues, en la mayoría de las situaciones experimentales estudiadas, la correlación inversa entre eventos adyacentes estuvo presente aún cuando la misma señal fue filtrada con diferentes frecuencia de corte (50-350 Hz; -3 dB). Por otra parte, a potenciales menos negativos, la amplitud de la corriente del canal abierto es menor y, por lo tanto, a estos potenciales, el efecto de este artefacto debiera ser más notorio. Sin embargo, los resultados de la figura 3.24 indican que sucede lo opuesto, la correlación inversa es más pronunciada a potenciales en los que la amplitud de la corriente es mayor.

Además de este trabajo, en el único canal de sodio modificado por BTX en que se ha estudiado la correlación entre las duraciones de los eventos abiertos y cerrados adyacentes

(métodos, sección 2.5.2.3; resultados, secciones 3.3.5 y 3.3.7.2), es el canal de sodio purificado de cerebro de perro (Keller y col., 1990). En este estudio los autores realizan cuatro tipos de análisis de correlación de un solo canal a dos potenciales: entre un evento abierto y el evento cerrado siguiente, entre un evento cerrado y el abierto siguiente, entre un evento abierto y el abierto siguiente y entre un evento cerrado y el cerrado siguiente. A partir de los ocho análisis para este canal, los autores sostienen que no existe correlación entre la duración de eventos adyacentes. Sin embargo, de los ocho análisis por lo menos en seis de ellos se aprecia claramente una leve correlación entre eventos adyacentes (las diferencias entre los valores extremos son del orden de un milisegundo). Los autores no reportan el número de eventos usados para calcular cada uno de los promedios, así que es difícil comparar la confiabilidad de sus resultados con los que se muestran en esta tesis. Por otra parte, dado que el grado de correlación es diferente de canal en canal y que además depende de P_o , es posible que Keller y cols. (1990) podrían obtener resultados distintos a potenciales en los cuales los valores de P_o son menores.

Los resultados que se muestran en la figura 3.24 muestran que el grado de correlación es mayor cuando los valores de P_o son menores que $1/2$, este es un resultado esperable, puesto que a estos potenciales la separación entre los dos componentes exponenciales de las distribuciones de tiempos de permanencia en el estado abierto es mayor. Resultados similares han sido encontrados en canal de K^+ activado por Ca^{++} de miotubos de rata (McManus y Magleby, 1989), en este canal el grado de correlación inversa se hace mayor al bajar la concentración de Ca^{++} .

4.3.4. El comportamiento cinético del canal puede ser explicado con un modelo cíclico.

4.3.4.1 Selección de modelos cinéticos

En esta tesis, se evaluó el comportamiento cinético de cinco modelos compuestos de dos estados abiertos y tres estados cerrados. La metodología usada comúnmente para evaluar cada uno de los modelos cinéticos sobre las distribuciones experimentales consiste en, obtener analíticamente las funciones de densidad de probabilidad (*fdp*) que describen las distribuciones de los tiempos de permanencia, hacer un ajuste de máxima verosimilitud de las distribuciones de

tiempos de permanencia a partir de las distintas *fdp*, evaluar la verosimilitud máxima obtenida a partir de cada modelo, según el valor de la verosimilitud obtenida se ponen los modelos en un escala de mejor a peor ajuste (Colquhoun y Hawkes, 1981; 1983; Colquhoun y Sigworth, 1983; Blatz y Magleby, 1986a). Las constantes cinéticas obtenidas a partir de este tipo de ajuste están subestimadas debido a la limitada resolución temporal de los sistemas de registro.

Esta metodología tiene un gran inconveniente, la corrección por eventos perdidos es muy compleja para modelos como los que se probaron en esta tesis (resultados, sección 3.3.6), no existe una solución general al problema de los eventos perdidos sino que todas las correcciones deben hacerse para cada caso particular, además de esto, las soluciones encontradas no siempre son únicas (Roux-Sauve, 1985; Blatz y Magleby, 1986b; McManus y cols., 1987).

Como alternativa a la metodología planteada en el párrafo anterior Magleby (1990), propuso un método de simulación iterativa, en este método, a partir de un modelo y constantes cinéticas dados, se simulan registros, a los registros simulados se les suma ruido eléctrico, son filtrados y analizados, las duraciones de los eventos abiertos y cerrados son distribuidas bidimensionalmente en pares de evento adyacentes. La verosimilitud del ajuste se evalúa sobre la distribución bidimensional del registro experimental. El uso de esta metodología requiere un trabajo computacional que puede ser varios órdenes de magnitud más extenso que el usado en este trabajo, pues requiere de la simulación de 10^6 eventos.

La metodología usada en esta tesis fue inspirada en el método de simulación iterativa planteada por Magleby (1990). Para evaluar cada modelo cinético se simulan registros a partir de cada modelo y un conjunto dado de constantes cinéticas, se ignoran todos los eventos menores que el tiempo muerto del sistema de registro, se construye las distribuciones de los tiempos de permanencia y se evalúa la verosimilitud del ajuste con la *fdp* generada (métodos, secciones 2.5.2.4 a 2.5.2.6). La búsqueda de un máximo en la verosimilitud se hace iterativamente, cambiando el valor de las constantes cinéticas y evaluando la nueva verosimilitud. Como se desprende de la descripción anterior, en la metodología planteada, el problema de la corrección por eventos perdidos se soluciona ignorando los eventos más breves que el tiempo muerto del

sistema de registro.

Sin embargo, debido a la naturaleza aleatoria del método de ajuste usado en este trabajo, al número de eventos simulados en cada iteración (10^5) y al algoritmo usado para generar los números aleatorios, fue imposible establecer cual de los modelos entrega un mejor ajuste a las distribuciones. Esto se aprecia en la tabla 3.4 que muestra que la bondad del ajuste ($L(\theta)$) y la posición en la escala de mejor a peor ajuste depende de el algoritmo usado para generar números aleatorios. Por esta razón, la elección del modelo que describe los datos fue hecha a partir de los resultados del análisis de correlación.

Modelos que den cuenta adecuadamente de las distribuciones de tiempos de permanencia pueden generar secuencias de eventos de apertura y cierre completamente diferentes, por lo tanto, el análisis de correlación entre eventos adyacentes es una herramienta que permite confrontar las historias generadas por diferentes modelos con la historia de un registro experimental. La selección de los modelos a partir de diferentes tipos de análisis de la historia de los registros es una metodología que ultimamente ha adquirido gran importancia (Montal y cols., 1984; Fredkin y cols., 1985; McManus y cols., 1985; Kerry y cols., 1988; Blatz y Magleby, 1989; McManus y Magleby, 1989; Keller y cols., 1990; Bates y cols., 1990).

4.3.4.2 *El modelo II.*

A partir del análisis de correlación entre eventos adyacentes ha sido posible seleccionar el modelo II. Este modelo predice adecuadamente la mayor parte de las características cinéticas del canal, por ejemplo, predice razonablemente los grados de correlación entre eventos adyacentes, tanto, de los canales provenientes de la preparación hecha en ausencia, como, en ausencia de inhibidores de proteasas (figuras 3.26 y 3.29B), este modelo predice razonablemente bien la fracción del tiempo en que el canal está abierto y la variación de P_o en función del tiempo (Figura 3.17). A partir de las constantes cinéticas del canal 'tipo' y sus respectivas valencias efectivas (tabla 3.5), el modelo también predice razonablemente bien el comportamiento de los componentes exponenciales de las distribuciones de tiempos de permanencia en función del voltaje (línea

continúa en las figuras 3.22 y 3.23).

En la tabla 3.5 se puede observar que las constantes cinéticas de los siete canales en los que se estudió el efecto del voltaje tiene valores que no difieren en más de un orden de magnitud, además, todas muestran valencias efectivas similares. A pesar de esto, es necesario considerar que las soluciones a las que converge el ajuste de las distribuciones para un modelo dado pueden no ser únicas y, por lo tanto, en otras soluciones las constantes cinéticas pueden adquirir valores y dependencias del voltaje diferentes.

4.3.4.3 *El modelo II puede explicar el comportamiento cinético de los canales provenientes de las preparaciones hechas en presencia y en ausencia de inhibidores de proteasas.*

A partir de los resultados de las figura 3.29 y 3.30 es posible concluir que el mismo modelo puede explicar razonablemente bien el comportamiento cinético de los canales provenientes de ambas preparaciones. Esto implica que las diferencias entre estos dos canales reside sólo en las características del sistema de conducción iónica, y por lo tanto, en el canal modificado por BTX los sistemas de conducción y de cinética de apertura y cierre estarían en diferentes partes del canal. Este resultado es concordante con la discrepancia encontrada para las estimaciones del potencial de superficie que se han hecho mediante los experimentos de conducción y de cinética, tanto en este canal (sección 4.3.2.3), como en el canal de sodio modificado por BTX del nervio optico de calamar (Behrens y cols., 1989; sección 4.3.2.3).

4.3.4.4. *Modelos cíclicos en otros canales.*

En varios canales en los que se ha estudiado su cinética en detalle se han encontrado resultados de correlación inversa entre las duraciones de eventos adyacentes. Por ejemplo, en el canal receptor de glutamato (Kerry y cols., 1988; Bates y cols., 1990), en el canal de K^+ activado por Ca^{++} y en el canal de Cl^- activado por el voltaje del músculo esquelético (McManus y cols., 1985; McManus y Magleby, 1989; Blatz y Magleby, 1986; 1989). Para estos canales y, además, para el canal receptor de acetilcolina (Dionne y cols., 1978; Labarca y cols., 1985) se han

propuesto modelos similares al propuesto en esta tesis para el canal de Na⁺ modificado por BTX, por lo tanto, este podría representar un mecanismo general que está presente en la cinética de apertura de todos los canales iónicos. Así el esquema general del modelo tendría el siguiente aspecto:



En este modelo, de derecha a izquierda, los estados cerrados son cada vez más prolongados en cambio los estados abiertos son cada vez más breves.

En 1965 Monod y cols. propusieron un modelo similar al 4.3 para explicar la cinética de las enzimas de comportamiento alostérico, por esta razón, la observación de un mecanismo cinético común para canales tan diferentes indica que la transición abierto-cerrado del canal parece corresponder a un mecanismo común de cambios conformacionales que está presente no solo en todos los canales iónicos, sino, que también en el resto de las proteínas.

4.3.4.5 Reversibilidad microscópica.

Recientemente Richards y Miller (1990) estudiando la secuencia de transiciones entre el estado cerrado y los dos estados de conductancia del canal de Cl⁻ de la anguila, encontró que el canal se abre preferentemente hacia el estado más conductor desde el estado cerrado y que cuando se cierra lo hace preferentemente desde el estado menos conductor. Este resultado indica que la cinética del canal de cloro no se encuentra en equilibrio termodinámico. Por otra parte, una de las suposiciones básicas de los estudios cinéticos es que la cinética de apertura y cierre de los canales se encuentra en equilibrio termodinámico (Colquhoun y Hawkes, 1983; Roux-Sauvie, 1985). En un esquema cinético cíclico en equilibrio, en promedio, la rapidez de los procesos en una dirección del ciclo es igual a la rapidez en la dirección contraria, formalmente, esto significa que el producto de las constantes cinéticas que en una dirección del ciclo es igual al producto de las constantes en dirección opuesta. En un sistema que no se encuentra en equilibrio debe existir un

flujo de energía acoplado al sistema.

En esta tesis la condición de equilibrio fue una suposición básica para la construcción del modelo II. A la luz de los resultados de Richards y Miller (1990) con el canal de Cl^- , fue interesante probar si la cinética del canal de Na^+ modificado por BTX se encuentra en equilibrio termodinámico. El razonamiento seguido para ensayar la condición de equilibrio ha sido el siguiente: Si la cinética del canal no se encuentra en equilibrio termodinámico, entonces uno de los sentidos del ciclo será usado en forma preferente, por ejemplo supongamos que el ciclo en la dirección $\dots O_1-O_2-C_4-C_3-O_1\dots$ es usado con más frecuencia que el ciclo en la dirección opuesta, $\dots O_1-C_3-C_4-O_2-O_1\dots$. En este caso, el canal pasará preferentemente al estado cerrado desde una apertura breve (O_2-C_4) y el evento cerrado terminará con más frecuencia con una apertura de larga duración (C_3-O_1), en consecuencia, la duración promedio del evento abierto que antecede a un evento cerrado será menor que la duración promedio del evento abierto siguiente al evento cerrado. Si el sentido preferencial es el inverso, entonces, la duración promedio de los eventos abiertos anteriores será mayor que la de los eventos posteriores al evento cerrado.

Para ensayar la condición de equilibrio se usó una variante de la metodología para establecer correlación entre las duraciones de eventos abiertos y cerrados adyacentes (métodos, sección 2.5.2.3, resultados, sección 3.3.5), la variación consistió en promediar por separado la duración de los eventos abiertos anteriores y posteriores al evento condicionante. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 4.5. En la ordenada se grafican las duraciones promedio de los eventos previos (círculos blancos) y posterior (círculos negros) a un evento cerrado de una duración dada (cerrado condicionante), la línea continua corresponde al promedio de todos los eventos adyacentes, anteriores y posteriores. Si el sistema no estuviera en equilibrio termodinámico, la duración promedio de, por ejemplo, los eventos previos al cerrado condicionante sería siempre mayor que la duración promedio de los eventos posteriores. Para los cerrados con duración menor que 3 milisegundos, la duración promedio de los eventos abiertos previos se aprecia mayor que la duración promedio de los eventos posteriores, para los eventos cerrados mayores que 3 milisegundos se observa lo opuesto. Para verificar si estas tendencias podrían

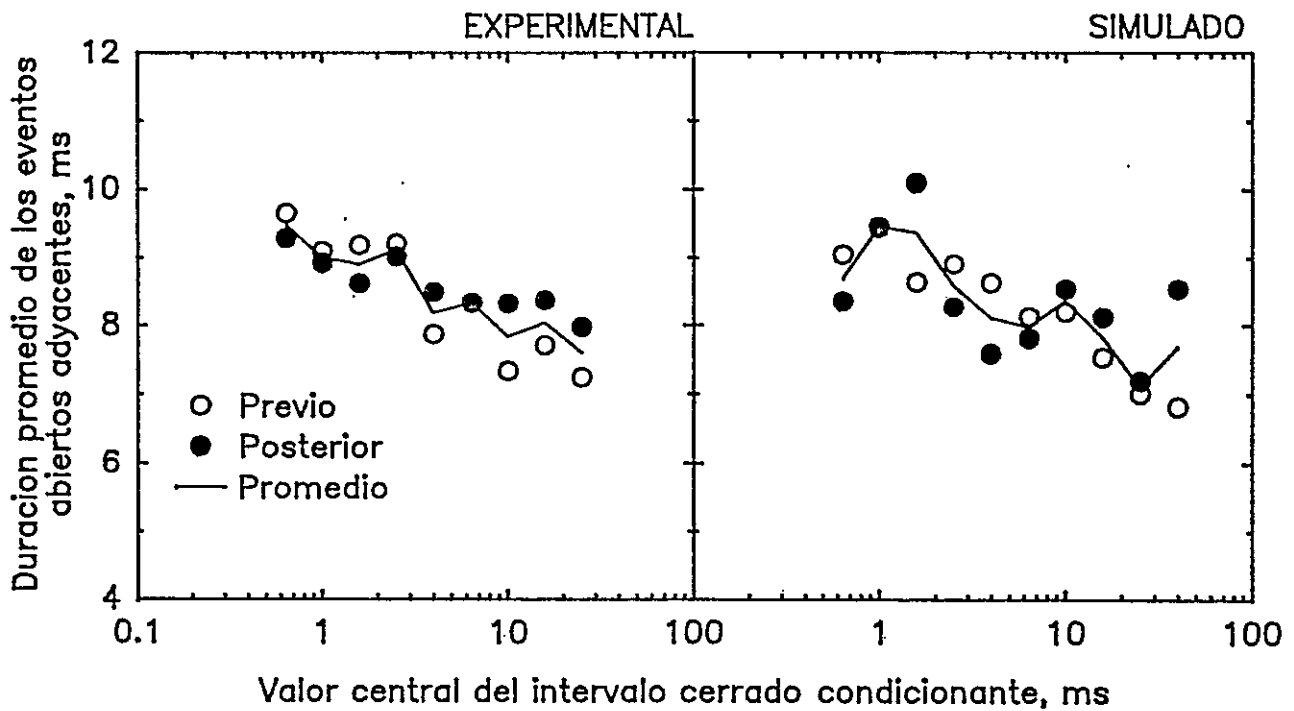


Figura 4.5 Ensayo de la condición de equilibrio.

Análisis de correlación entre eventos abiertos y cerrados adyacentes. Los círculos blancos corresponden al promedio de por lo menos 50 eventos que antecedieron a un evento cerrado cuya duración se encontraba dentro del intervalo condicionante. Los círculos negros corresponden al promedio de los eventos adyacentes posteriores. La línea continua corresponde al promedio entre eventos anteriores y posteriores. El cuadro marcado como 'experimental' corresponde a los resultados del canal que se muestra en la figura 3.25. El cuadro marcado como 'simulado' corresponde al análisis de correlación aplicado en un registro simulado a partir de las constantes cinéticas obtenidas del ajuste de las distribuciones de tiempos de permanencia mostradas en la figura 3.25 con el modelo II.

deberse simplemente al azar, a partir del modelo II se simuló un número equivalente de eventos (\approx 5000 eventos), y fue sometido al mismo análisis, los resultados se muestran en el panel de la derecha. Dada la dispersión de los datos simulados, es perfectamente posible concluir que las diferencias entre las duraciones promedio de los eventos previos y posteriores del registro experimental es debida al azar. Por lo tanto el sistema está en equilibrio termodinámico.

Para los canales de K^+ activado por Ca^{++} y receptor de glutamato se han propuesto modelos cíclicos. En ellos se ha hecho este mismo tipo de análisis (McManus y Magleby, 1989; Kerry y cols., 1988) y para ambos canales se ha podido concluir que su comportamiento cinético se encuentra en equilibrio termodinámico.

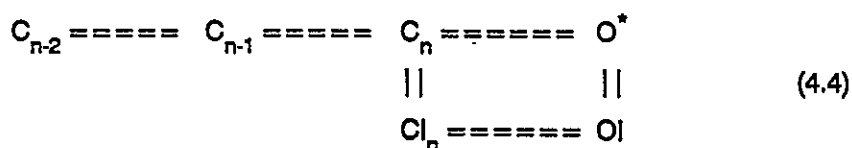
4.4. Efecto de la BTX sobre los canales de sodio.

La batracotoxina es un alcaloide hidrofóbico con $pK_a=7,5$ (Alburquerque, 1972). la discusión que sigue a continuación se supone que la forma protonada de la BTX es la forma activa de la toxina.

Se ha descrito que la batracotoxina además de eliminar la inactivación produce al menos otros tres efectos sobre el canal de sodio: i.- Prolonga la duración de los eventos abiertos en más de un orden de magnitud y desplaza la curva de activación hacia potenciales negativos (Quandt y Narahashi, 1982). ii.- Reduce la conductancia de los canales (Quandt y Narahashi, 1982; Correa y cols., 1991). iii.- decrece la selectividad iónica de los canales (Huang y cols., 1982; Hille, 1984; Khodorov, 1985). La unión de la toxina al canal es un proceso de primer orden (Khodorov, 1985) y su efecto sobre las corrientes de sodio del músculo esquelético se prolonga por más de una hora después de lavar la toxina (Narahashi y cols., 1971). Por lo tanto, en cada uno de los experimentos de esta tesis, cada canal de sodio observado en la bicapa estaba ligado irreversiblemente (en la escala de tiempo del experimento) a una sola molécula de BTX. En esta sección revisaremos el efecto de la BTX sobre las propiedades del canal de sodio y discutiremos los posibles mecanismos por el cual una sola molécula de BTX puede tener efectos tan variados sobre el canal.

4.4.1 Efecto de la BTX sobre la cinética del canal.

El fenómeno de inmovilización de cargas sugirió que los procesos de activación e inactivación están acoplados y, por lo tanto, el canal debe abrirse antes de ser inactivado (Armstrong y Bezanilla, 1977; introducción, sección 1.2.2.2). Cuando el canal se abre expone hacia el lado citoplasmático una carga negativa que puede ligar a un grupo móvil de la proteína cargado positivamente ('grupo móvil'). Cuando el grupo móvil se liga a la carga negativa expuesta bloquea la vía de conducción. Esta visión no es completamente aceptada, puesto que los registros de canales individuales muestran que el canal puede pasar al estado inactivado sin llegar a abrirse (ver por ejemplo, Horn y cols., 1981; Aldrich y cols., 1983; Horn y Vandenberg, 1984). En consecuencia, para mantener el modelo de Armstrong y Bezanilla es necesario suponer que la carga negativa es expuesta hacia el lado interno y se une al 'grupo móvil' en alguna de las etapas previas a la apertura del canal. El esquema que describe el comportamiento cinético de los canales de sodio no modificados es el siguiente (Tanguy y Yeh, 1988):



en que O^* y $O|$ corresponden a los estados abierto (conductor) e inactivado, respectivamente, C_{n-2} y C_{n-1} corresponden a los estados desde los cuales el canal no puede inactivarse (es decir, en los que la carga negativa no se expone hacia el interior) y dan cuenta del acoplamiento entre la cinética de apertura y la cinética de inactivación, C_n corresponde a los estados cerrados desde los cuales el canal puede pasar al estado inactivado ($C|_n$). A partir de este marco conceptual revisaremos el efecto de la BTX sobre la cinética del canal de sodio.

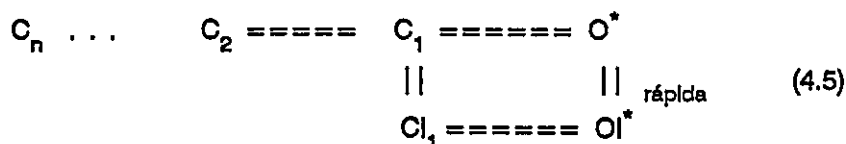
4.4.1.1. La BTX se une al estado abierto.

Sí la fibra nerviosa es sometida a estimulación repetitiva, la cinética de modificación de los canales de sodio del nodo de Ranvier es más rápida que en condiciones de reposo, además, la cinética también es más rápida cuando las despolarizaciones se hacen desde un potencial de

mantención más negativo (Khodorov, 1985; Tanguy y cols., 1984). Estos resultados indican que la unión de la BTX se produce cuando el canal se encuentra en el estado abierto-no-inactivado. La unión de la toxina produce una estabilización de la conformación abierta, en estas condiciones, la energía libre del estado abierto es menor y entonces, se requieren despolarizaciones menores para abrir el canal. Este mecanismo explicaría la prolongación de los tiempos de permanencia en el estado abierto y el desplazamiento de la curva de activación hacia potenciales negativos (Khodorov, 1985; Huang y cols., 1987; sección 4.3.1.3). Por otra parte, dado que la BTX no se une al canal inactivado es posible suponer que la toxina compite con el 'grupo móvil' por la carga negativa que se expone cuando el canal se abre. Sin embargo, a diferencia del 'grupo móvil', la toxina no bloquea el sistema de conducción (Khodorov, 1985; Tanguy y Yeh, 1988), en consecuencia la BTX sería un análogo de la compuerta de inactivación que no inactiva el canal.

Además, la unión de BTX es inhibida competitivamente por una gran variedad de anestésicos locales (Creveling y cols., 1983) lo que sugiere que la toxina puede unirse al vestíbulo hidrofóbico que posee la boca interna del canal (Hille, 1984). Cuando el canal se cierra, la toxina permanece en el vestíbulo hidrofóbico de la misma manera que lo hacen los anestésicos locales.

En axones tratados con BTX se ha observado que, a pesar que la inactivación ha sido eliminada, el fenómeno de inmovilización de cargas persiste, además, la cinética de inmovilización de cargas se hace más rápida. Estos resultados indican que durante el proceso de apertura, apenas se expone la carga negativa, esta es ligada rápidamente por la BTX (inmovilización de la carga) debido a que la toxina permanece en la misma posición que tenía al cerrarse el canal (Tanguy y Yeh, 1988). Según esta visión el estado inactivado del canal nativo se convierte en un estado conductor en el canal modificado por BTX. Entonces, en presencia de BTX el esquema cinético de los canales de sodio se convierte en el siguiente:

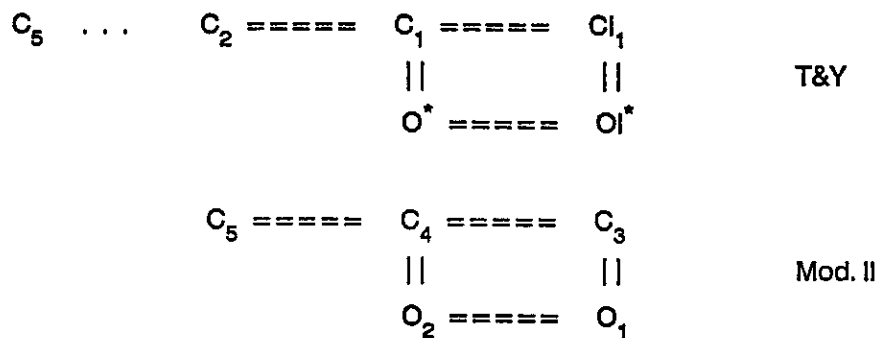


en que O^* y O_1^* son estados conductores. A este modelo le llamaremos T&Y.

Se ha propuesto que la pronasa elimina la inactivación de los canales de sodio destruyendo el 'grupo móvil' (Armstrog y Bezanilla, 1977), por lo tanto, una predicción del modelo de acción de la BTX consistiría en observar que la cinética de modificación de los canales por BTX es acelerada notablemente debido al tratamiento con pronasa, además, dado que la BTX se une irreversiblemente al canal, tanto la conductancia como la cinética de los canales tratados con pronasa y BTX debiera ser idéntica a la cinética de los canales tratados sólo con BTX. Por otra parte, puesto que el mecanismo de inactivación es dependiente del voltaje (Vandenberg y Horn, 1984; Yue y cols., 1989; Scanley y cols., 1989), la cinética de unión de la BTX a los canales tratados con pronasa debe mostrar la misma dependencia del voltaje que la inactivación, por ejemplo, las estimaciones para la dependencia del voltaje de la constante cinética de inactivación para los canales de sodio de las célula GH3, cardiocitos y células de Purkinje son 2, 1,3 y 1 cargas electrónicas, respectivamente (Vandenberg y Horn, 1984; Yue y cols., 1989; Scanley y cols., 1989), en consecuencia, la dependencia del voltaje de la cinética de unión de BTX al canal tratado con pronasa debe tener alguna de estas valencias efectivas.

4.4.1.2. Comparación entre el modelo II y el modelo de Tanguy y Yeh.

La similitud entre el esquema cinético 4.5 y el modelo II de la sección 3.3.7 es notable, intercambiando las posiciones de Cl_1 y O^* , esta similitud se aprecia mejor:



Entre estos esquemas cinéticos la diferencias residen en el número de estados cerrados (seis para T&Y y tres para el modelo II). En el modelo T&Y para el canal modificado por BTX existen dos estados conductores, el estado abierto-modificado (O^*) y el estado abierto-inactivado-

modificado (O_1^*) que por efecto de la BTX conduce. En esta tesis, la elección del modelo II como el que mejor describe el comportamiento cinético de los canales de sodio modificados por BTX es concordante con este modelo, pues:

i.- Los análisis de las distribuciones de tiempos de permanencia en los estados abierto y cerrado muestran la existencia de por lo menos dos estados abiertos y tres estados cerrados (resultados, sección 3.3.3). Como resultado de esta comparación, en el modelo II los estados O_1 y O_2 se corresponden con los estados O_1^* y O^* del modelo T&G, respectivamente.

ii.- Así como en el esquema 4.4 la despolarización aumenta la probabilidad de encontrar el canal en los estados abierto e inactivado, en el modelo II la despolarización aumenta la probabilidad de encontrar al canal en cualquiera de los dos estados abiertos.

iii.- En todos los modelos cinéticos propuestos para el canal de sodio no modificado, como efecto de la despolarización, el aumento de la probabilidad de encontrar el canal abierto depende de la prolongación de los tiempos de permanencia en el estado abierto (O^*), este efecto del voltaje también es encontrado en el estado O_2 que en el modelo II es el único cuya duración es dependiente del voltaje (resultados, Fig. 3.22).

iv.- En el modelo II, la constante k_{21} es homóloga a la constante cinética de inactivación del esquema 4.4. La valencia efectiva determinada para esta constante ($n_{21} = 1,3$; resultados, tabla 3.5) es comparable a las valencias efectivas de las constantes de inactivación obtenidas en los estudios de canales únicos no modificados (0,8-2,7; Vandenberg y Horn, 1984; Yue y cols., 1989; Scanley y cols., 1989). Además, este valor pone un límite superior a la dependencia del voltaje de la constante cinética de inactivación para los canales de rana, pues este valor está sobreestimado debido a que por razones metodológicas, el valor de k_{12} fue fijado en 10 s^{-1} .

La mayor discrepancia entre los modelos reside en la rapidez de la cinética, pues el modelo T&Y predice que la duración del estado O^* es muy breve, pues la cinética de inmovilización de cargas es más rápida en el axón tratado con BTX que en el axón no tratado (Tanguy y Yeh, 1988) y en consecuencia, a un voltaje dado, la duración promedio de O^* debiera ser menor que en el canal no modificado. Sin embargo los resultados de esta tesis indican que los tiempos promedios

de permanencia en el estado abierto para el canal modificado son mucho mayores que los resultados descritos para los canales no modificados, por ejemplo a $V=V_0$, el tiempo promedio de permanencia en el estado abierto predichos por el modelo II es ≈ 6 ms, en cambio, en el canal no modificado se obtienen tiempos promedios de permanencia de ≈ 1 ms (Por ejemplo, Quandt y Narahashi, 1982; Horn y Vandenberg, 1984; Kunze y cols., 1985; Kirsch y Brown, 1989). Estos resultados se han obtenido a ≈ 10 °C. Suponiendo $Q_{10} = 3$ (Hodgkin y cols., 1952), a temperatura ambiente estos valores de tiempos promedio equivalen a $\approx 0,3$ ms, es decir, la cinética de los canales modificados por BTX es ≈ 20 veces más lenta que la cinética de los canales no modificados (Quandt y Narahashi, 1982; Khodorov, 1985). En la próxima sección se discutirá una explicación para esta discrepancia.

4.4.1.3. La BTX estabiliza el estado abierto del canal.

Si además de eliminar la inactivación de los canales de sodio, la BTX estabiliza la conformación abierta del canal pero no afecta la energía libre del estado cerrado, entonces, a cualquier potencial, la probabilidad de encontrar el canal abierto es mayor que en el canal no tratado, es decir desplaza la curva de activación hacia potenciales negativos. Siguiendo el razonamiento usado con el modelo G&A para explicar el efecto de los cationes divalentes sobre la curva de activación de los canales de sodio (sección 4.3.2.1), un desplazamiento de -50 mV en la curva de activación de los canales tratados con BTX (Huang y cols., 1982) es producido por un desplazamiento de -100 mV en la relación entre los tiempos promedios de permanencia en el estado abierto y el voltaje. A temperatura ambiente -100 mV equivale a ≈ -4 kT/e. Esto, equivale a reducir en un factor de e^{-4} ($1/55$) todas las constantes cinéticas que abandonan cualquiera de los estados abiertos. Según esta visión, en el esquema cinético de los canales modificados por BTX las constantes cinéticas que abandonan el estado abierto son 55 veces más rápidas que en el canal modificado. Entonces, en el modelo II bastará con multiplicar por 55 las constantes k_{12} , k_{13} y k_{24} , para desplazar la curva de activación en 50 mV y para que a $V=V_0$ los tiempos promedios de permanencia en los estados abierto y cerrados sean comparables con los de los canales no

modificados.

Usando el modelo II y a partir de los valores promedios de las constantes cinéticas y sus valencias efectivas, (Tabla 3.5), se calculó los tiempos promedios de permanencia en el estado abierto y cerrado del canal (cuando $V=V_0$) obteniendo valores de 6,4 ms para ambos tiempos promedios. Suponiendo que el estado abierto con 4 kT de energía libre adicional (k_{12} , k_{13} y k_{24} son 55 veces más rápidas que las que se muestran en la tabla 3.5), el desplazamiento calculado para la curva de activación es de +48 mV, además en este nuevo valor de V_0 , el tiempo promedio de permanencia en los estados abierto y cerrado son de 0,13 ms, este valor concuerda razonablemente con el valor esperado a temperatura ambiente para en los canales no modificados por BTX (0,3 ms). Por lo tanto, la hipótesis del efecto estabilizador de la BTX sobre la conformación abierta del canal es razonable, pues predice el desplazamiento en el eje del voltaje de la curva de activación y la lentitud de la cinética de los canales modificados por BTX en comparación con la de los canales no modificados.

4.4.2. Efecto de la BTX sobre la conducción y el modelo de la puerta entreabierta.

La localización de la BTX en el vestíbulo hidrofóbico es muy probable, ya que, la unión de BTX es inhibida por los anestésicos locales (Creveling y cols., 1983), pero a diferencia de estos, la toxina no bloquea completamente el sistema de conducción ('foot in the door', aquí le llamaremos 'la puerta entreabierta'). Esta explicación fue propuesta por Khodorov (1985) y explica la reducción de la conductancia, sin embargo, los cambios de selectividad inducidos por BTX son difíciles de explicar en términos de una obstrucción parcial del vestíbulo hidrofóbico. La BTX parece actuar directamente sobre el sistema de conducción.

En la hipótesis alternativa de que la BTX se une a la carga negativa que se expone al interior cuando el canal se abre (Tanguy y Yeh, 1988), los cambios que promueve la BTX sobre el sistema de conducción sugieren que esta carga negativa participa en el mecanismo de conducción.

5.- REFERENCIAS

- Agnew, W. S., Levinson, S., Brabson, J. y Raftery, M. 1978. Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2606-2610.
- Albuquerque, E. 1972. The mode of action of batrachotoxin. Federation Proc. 31:1133-1138.
- Aldrich, R., Corey, D. y Stevens, C. 1983. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. Nature (Lond.) 306:436-441.
- Alvarez, O. 1986. Kinetic models and channel fluctuations. En: IONIC CHANNELS IN CELLS AND MODEL SYSTEMS. (Editor: R. Latorre). Plenum Press. New York, pp. 1-15.
- Alvarez, O., Benos, D., Latorre, R. 1986. Study of ionic channels in planar lipid bilayer membranes. Electrophys. Tech. 12: 159-177.
- Alvarez, O., Villarroel, A. y Eisenman, G. 1991. A general procedure to calculate ion currents from energy profiles in a three-barrier two-site channel model. Capítulo en ION CHANNELS (Editores: Rudy, B. y Iverson, L). Volumen en METHODS IN ENZYMOLOGY, (Editores: Abelson, J. y Simon, M.) Academic press, Orlando, USA.
- Armstrong, C.M. 1975. Potassium pores of nerve and muscle membranes. Capítulo en MEMBRANES, Vol. 3. LIPID BILAYERS AND BIOLOGICAL MEMBRANES: DYNAMIC PROPERTIES. (Editor: George Eisenman) Marcel Dekker, INC. N.Y. pp. 325-358.
- Armstrong, C., Bezanilla, F. y Rojas, E. 1973. Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. J. Gen. Physiol. 62:375-391.
- Armstrong, C. y Bezanilla, F. 1974. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates in the Na channels. J. Gen. Physiol. 63:533-552.
- Armstrong, C. y Bezanilla, F. 1977. Inactivation of the sodium channel. II. Gating currents experiments. J. Gen. Physiol. 70:567-590.
- Backx, P., Marban, E. y Yue, D. 1990. Flicker block of cardiac Na channels by Cd⁺⁺ and protons. Biophys. J. 57: 298a (Abstr.)

- Barchi, R., Cohen, S. y Murphy, L. 1980. Purification from rat sarcolemma of the saxitoxin-binding component of the excitable membrane sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1306-1310.
- Bates, S., Sansom, F., Ball, R., Ramsey, L y Usherwood, N. 1990. Glutamate receptor-channel gating: maximum likelihood analysis of gigaohm seal recording from locust muscle. *Biophys. J.* 58:219-229.
- Begenisich, T y Cahalan M.D. 1980a. Sodium channel permeation in squid axons I: reversal potential experiments. *J. Physiol.* 307:217-242.
- Begenisich, T. y Cahalan M.D. 1980b. Sodium channel permeation in squid axons II: non-independence and current voltage relations. *J. Physiol.* 307:243-257.
- Begenisich, T. y Busath, D. 1981. Sodium flux ratio in voltage-clamped squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 77:489-502.
- Behrens, M.I., Oberhauser, A., Bezanilla, F. y Latorre, R. 1989. Batrachotoxin-modified sodium channels from squid optic nerve in planar bilayers: ion conduction and gating properties. *J. Gen. Physiol.* 93: 23-41.
- Bezanilla, F. 1985. A high capacity data recording device based on a digital audio processor and a video cassette recorder. *Biophys. J.* 47:437-441.
- Blatz, A. y Magleby, K. 1986a. Correcting single channel data for missing events. *Biophys. J.* 49:967-980.
- Blatz, A. y Magleby, K. 1986b. Quantitative description of three modes of activity of fast chloride channels from rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 378: 141-174.
- Blatz, A. y Magleby, K. 1989. Adjacent intervals analysis distinguishes among gating mechanisms for the fast chloride channel from rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 410: 561-585.
- Brink, F. 1954. The role of calcium ions in neural processes. *Pharmacol. Rev.* 6:243-298.
- Cachelin, A.B., de Peyer, J.E., Kokubun, S. y Reuter, H. 1983. Sodium channels in cultured cardiac cells. *J. Physiol.* 340:389-401.
- Cai, M. y Jordan, P. 1990. How does vestibule surface charge affect ion conduction and toxin binding in a sodium channel?. *Biophys. J.* 57:883-891.
- Caille, J., Ildefonse, M., Rougier, O. 1978. Existence of a sodium current in the tubular membrane of frog twitch muscle fiber; implication in excitation contraction. *Pflügers Arch.* 374:167-177.
- Catterall, W. 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242:50-61.
- Cecchi, X., Alvarez, O. y Latorre, R. 1981. A three-barrier model for the hemocyanin channel. *J. Gen. Physiol.* 78: 657-681.
- Cecchi, X., Wolff, O., Alvarez, O. y Latorre, R. 1987. Mechanisms of Cs^+ blockade in a Ca^{2+} activated K^+ channel from smooth muscle. *Biophys. J.* 52:707-716.

- Colquhoun, D. y Sigworth, F. 1983. Fitting and Statistical analysis of single-channel records. En: SINGLE CHANNEL RECORDING (Editores: B. Sackmann y E. Neher). Plenum Press, New York. pp. 191-263.
- Colquhoun, D. y Hawkes, A. 1981. On the stochastic properties of single ion channels. Proc. Roy. Soc. B 211: 205-235
- Colquhoun, D. y Hawkes, A. 1983. The principles of stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. En: SINGLE CHANNEL RECORDING (Editores: B. Sackmann y E. Neher). Plenum Press, New York. pp. 135-175.
- Coronado R., Latorre R. 1983. Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes. Biophys. J. 43:231-236.
- Coronado, R., and C. Miller. 1979. Voltage-dependent caesium blockade of a cation channel from sarcoplasmic reticulum. Nature (Lond.) 280:807-810.
- Coronado, R., Rosenberg, R. y Miller, C. 1980. Ionic selectivity saturation and block in a K^+ selective channel from sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol. 76:425-446.
- Correa, A.M., Latorre, R. y Bezanilla, F. 1991. Ion permeation in normal and batrachotoxin-modified Na^+ channels in the squid giant axon. J. Gen. Physiol. En prensa.
- Creveling, C., McNeal, E., Daly, J. y Brown, G. 1983. Batrachotoxin-induced depolarization of [3H]batrachotoxine-A 20- α -benzoato binding in a vesicular preparation from ginea-pig cerebral cortex. Inhibition by local anaesthetics. Molec. Pharmac. 23:350-358.
- Cukierman, S., Zinkand, W., French, R. y Krueger, B. 1988. Effect of membrane surface charge and calcium on the gating of rat brain sodium channels in planar bilayers. J. Gen. Physiol. 92:431-448.
- Dani, J. 1986. Ion-channel entrances influences permeation. Net charge, Size, shape, and binding considerations. Biophys. J. 49:607-618.
- DeFellice, L. y Clay, J. 1983. Membrane current and membrane potential from single-channel kinetics. En: SINGLE CHANNEL RECORDING (Editores: B. Sackmann y E. Neher). Plenum Press, New York. pp. 323-342.
- Demo, S. y Yellen, G. 1990. Permeant ion effects on gating of the large conductance C^{++} -activated K^+ channel from rat skeletal muscle. Biophys. J. (Abstr.) 57:15a
- Denbigh, K.G. 1951. The Thermodynamics of the steady state. Methuen, London; Wiley, N.Y.
- Dionne, V.E., Steinbach, J.H. y Stevens, C.F. 1978. An analysis of the dose-response relationship at voltage-clamped frog neuromuscular junction. J. Physiol. 281:421-444.
- Eisenman, G. y Dani, J. 1986. Characterizing the electrical behavior of an open channel via the energy profile for ion permeation. A prototype using a fluctuating barrier model for the acetylcholine receptor channel. En: IONIC CHANNELS IN CELLS AND MODEL SYSTEMS (Editor: Ramón Latorre). Plenum press, N.Y.
- Eisenman, G., Latorre, R. y Miller, C. 1986. Multi-ion conduction and selectivity in the high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel from skeletal muscle. Biophys. J. 50:1025-1034.

- Fox., J. 1987. Ion channel subconductance states. *J. Memb. Biol.* 97:1-8.
- Fredkin, D., Montal, M. y Rice, J. 1985. Identification of aggregated Markovian models: applications to the nicotinic acetylcholine receptor. En: PROCEEDINGS OF THE BERKELEY CONFERENCE IN HONOR OF JERZY NEYMAN AND JACK KEIFER (Editores: Le Cam, L. y Olhson, R.) Wdsworth Publishing Co., Belmont, CA. 269-289.
- Frankenhaeuser, B. y Hodgkin A.L. 1957. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *J. Physiol. (Lond.)* 137:218-244.
- French, R., Worley, J., Blaustein, M., Romine, W., Tam, K. y Krueger, B. 1986a. Gating of batracotoxin-activated sodium channel in lipid bilayers. En: ION CHANNEL RECONSTITUTION (Ed. C. Miller). Plenum press, New York. pp. 363-383.
- French, R., Krueger, B. y R., Worley, J. 1986b. From Brain to bilayer. Sodium channels from rat neurons incorporated into planar lipid membranes. En: IONIC CHANNELS IN CELLS AND MODEL SYSTEMS (Editor: R. Latorre). Plenum press, N.Y.
- Garber, S.S. 1988. Symmetry and asymmetry of permeation through toxin-modified Na⁺ channels. *Biophys. J.* 54:767-776.
- Geletyuk, Y. y Kazachenko, Y. 1985. Single Cl⁻ channels in molluscan neurons: Multiplicity of the conductance states. *J. Membr. Biol.* 86:9-15.
- Gilly, F. y Armstrong, C. 1982. Slowing of sodium channel opening kinetics by extracellular zinc. *J. Gen. Physiol.* 79:935-964.
- Glasstone, S., Laider, K.J. y Eyring, H. 1941. The theory of rate processes. McGraw Hill, N.Y.
- Grahame, D.C. 1947. The electrical double layer and the theory of electrocapillarity. *Chemical Rev.* 41:441-501.
- Graton, K., Lamber, J.J., Ramsey, R. y Usherwood, P. 1981. Non-random openings and concentration-dependent lifetime of the glutamate-gated channel in muscle membrane. *Nature (Lond.)*,291:423-425.
- Goldman, D. E. 1943. Potential, Impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27:37-60.
- Green, W., Weiss, L. y Andersen, O. 1987a. Batracotoxin-modified sodium channels in planar lipid bilayers: Ion permeation and block. *J. Gen. Physiol.* 89: 841-872.
- Green, W., Weiss, L. y Andersen, O. 1987b. Batracotoxin-modified sodium channels in planar lipid bilayers: Characterization of saxitoxin- and tetrodotoxin-induced channel closures. Ion permeation and block. *J. Gen. Physiol.* 89: 873-903.
- Hagiwara, S., Miyazaki, S., Krasne, S. y Ciani, S. 1977. Anomalous permeabilities of the egg cell membrane of a starfish in K⁺-TI⁺ mixtures. *J. Gen. Physiol.*70:269-281.
- Hahn R. y Campbell, D. 1983. Simple shifts in the voltage dependence of sodium channel gating caused by divalent cations. *J. Gen. Physiol.* 82:785-806.
- Hartree, E. 1972. *Annal. Biochem.* 48: 422-427.

- Hartshone R.P., Catterall W.A. 1981. Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 4620-4624.
- Hess, P. y Tsien, R.W. 1984. Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature (Lond.)*. 309:453-456.
- Hess, P., Lansman, J.B. y Tsien, R.W. 1984. Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature (Lond.)*. 311:538-544.
- Hidalgo, C. 1986. Isolation of muscle membranes containing functional ionic channels. En: *IONIC CHANNELS IN CELLS AND MODEL SYSTEMS* (Editor. R. Latorre). Plenum press, New York. pp. 101-125.
- Hidalgo, C., Parra, C., Riquelme, G. y Jaimovich, E. 1986. Transverse tubules from frog skeletal muscle: Purification and properties of vesicles sealed with the inside-out orientation. *Biochim. Biophys. Acta.* 855:79-88.
- Hille, B. 1984. *IONIC CHANNELS OF EXCITABLE MEMBRANES*. Sinahuer Associates Inc. Mass. USA.
- Hille, B. 1975a. Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four barrier model. *J. Gen. Physiol.* 66: 536-560.
- Hille, B. 1975b. Ionic selectivity of Na and K channels of nerve membranes. En: *MEMBRANES - A SERIES OF ADVANCES*, Vol. 3: *LIPID BILAYERS AND BIOLOGICAL MEMBRANES: DINAMIC PROPERTIES*, (Editor: G. Eisenman). Marcel Dekker, N.Y. 255-323.
- Hille, B., Woodhull, A.M. y Shapiro, B.I. 1975. Negative surface charge near sodium channels of nerve: divalent ions, monovalent ions, and pH. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 270:301-318.
- Hodgkin, A.L. y Katz B. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108:37-77.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500-544.
- Hodgkin A.L., Keynes, R.D. 1955. The potassium permeability of a giant nerve fibre. *J. Physiol.* 128:61-88.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F. y Katz, B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116: 424-448.
- Horn, R., y Lange, K. 1983. Estimating kinetic constants from single channel data. *Biophys. J.* 43:207-223.
- Horn, R. y Vandenberg, C.A. 1984. Statistical properties of single sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 84:505-534.
- Horn, R., Patlak, J y Stevens, C. 1981. Sodium channels need not to open before they inactivate. *Nature.* 291: 426-427.
- Huang, L.M., Moran, N. y Ehrenstein G. 1982. Batrachotoxin modifies the gating kinetics of sodium channels in internally perfused neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:2082-2085.

- Huang, L.M., Moran, N. y Ehrenstein G. 1984. gating kinetics of batrachotoxin-modified sodium channels in neuroblastoma cells determined from single-channel measurements. *Biophys. J.* 45:313-322.
- Huang, L.M., Yatani, A. y Brown, A.M. 1987. The properties of batrachotoxin-modified cardiac Na channels, including state dependent block by tetrodotoxin. *J. Gen. Physiol.* 90:341-360.
- Hunter, M. y Geibisch, G. 1987. Multi barreled K channels in renal tubules. *Nature* 327:522-524.
- Jordan, P., Bacquet, R., McCammon, J. y Tran, P. 1989. How electrolyte shielding influences the electrical potential in transmembrane ion channels. *Biophys. J.* 55:1041-1052.
- Kayano, T., Noda, M., Flockerzi, V., Takahashi, H. y Numa, S. 1988. Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* 228:187-194.
- Keller, B., Montal, M.S., Hartshorne, P. y Montal, M. 1990. Two dimensional analysis of single channel currents from reconstituted acetylcholine receptors and sodium channels. *Arch. Biochem. Biophys.* 276:47-54.
- Keynes, R. y Rojas, E. 1974. Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J. Physiol.* 239:393-434.
- Kerry, C.J., Ramsey, R.L., Sansom, M.S.P. y Usherwood, P.N.R. 1988. Glutamate receptor channel kinetics. The effect of glutamate concentration. *Biophys. J.* 53:39-52.
- Khodorov, B. 1985. Batrachotoxin as a tool to study voltage-sensitive sodium channels of excitable membranes. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 45:57-148.
- Kirsch, G.F. y Brown, A.M. 1989. Kinetic properties of sodium channels in rat heart and rat brain. *J. Gen. Physiol.* 93:85-99.
- Krueger B.K., Worley J.F., French R.J. 1983. Single sodium channels from rat brain incorporated into planar lipid bilayer membranes. *Nature (Lond.)* 303: 172-175.
- Kunze, D.L., Lacerda, A.E., Wilson, D.L. y Brown, A.M. 1985. Cardiac sodium channels and the inactivity, reopening, and waiting properties of single sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 86:697-719.
- Labarca, P., Rice, J.A., Fredkin, D.R. y Montal, M. 1985. Kinetic analysis of channel gating, application to the cholinergic receptor channel and the chloride channel from *Torpedo californica*. *Biophys. J.* 47:469-478.
- Latorre, R. 1986a. ION CHANNELS IN CELLS AND MODEL SYSTEMS (Editor). Plenum press, New York.
- Latorre, R. y Miller, C. 1983. Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Memb. Biol.* 71: 11-30.
- Latorre, R., C. Vergara, and C. Hidalgo. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 77: 7484-7486.

- Latorre, R., Labarca, P. y Naranjo, D. 1991. Surface charge effects on ion conduction in ion channels. Capitulo en ION CHANNELS (Editores: Rudy, B. y Iverson, L). Volumen en METHODS IN ENZYMOLOGY, (Editores: Abelson, J. y Simon, M.) Academic press, Orlando, USA.
- Lazdunski, M. 1982. *Centruroides* toxin, a selective blocker of surface Na^+ channel in skeletal muscle: Voltage clamp analysis and biochemical characterization of the receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3896-3900.
- Leibovitch, L., Fischbarg, J., Konlarek, J., Todorova, I. y Wang, M. 1987. Fractal models of ion-channels kinetics. Biochim. Biophys. Acta. 896:173-180.
- Levinson, R., Thornhill, W., Duch, D., Recio-Pinto, E. y Urban, B. 1990. The role of nonprotein domains in the function and synthesis of voltage-gated sodium channels. En ION CHANNELS Vol. 2 (Editor T. Narahashi). Plenum press, New York. pp. 33-63.
- Mackinnon, R., Latorre, R. y Miller, C. 1989. Role of surface electrostatics in the operation of a high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. Biochemistry, 28:8092-8099.
- Magleby, K. 1990. Estimating kinetic rate constants for single channels using simulated two-dimensional distributions: a general method to account for the true effects of limited time resolution and noise. Biophys. J. (Abstr.) 57:15a.
- Matsuda H., Matsuura, H. y Noma, A. 1989. Triple-barrel structure of inwardly rectifying K^+ channel revealed by Cs^+ and Rb^+ Block in guinea-pig heart cells. J. Physiol. 413:139-152.
- McLaughlin, S.G.A. 1977. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. Curr. Top. Membr. Transp. 9:71-144.
- McLaughlin, S.G.A. 1989. The electrostatic properties of membranes. Ann. Rev. Biophys. Chem. 18:113-136.
- McLaughlin, S.G.A., Szabo, G., Eisenman, G. y Cianl. S.M. 1971. Surface charge and the conductance of phospholipids membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67:1238-1275.
- McManus, O., Blatz, A. y Magleby, K. 1985. Inverse relationship of the durations of the adjacent open and shut interval for Cl and K channels. Nature 317: 625-628.
- McManus, O., Blatz, A. y Magleby, K. 1987. Sampling, log binning, fitting and plotting durations of open and shut intervals from single channels and effect of noise. Pflügers Arch. 410:530-553.
- McManus, O. y Magleby, K. 1989. Time constant independent of previous single channel activity suggest Markov gating for large conductance Ca-activated K channel. J. Gen. Physiol. 94: 1037-1070.
- Methfessel, C. y Boehm, C. 1982. The gating of single calcium dependent potassium channel is described by an activation-blockade mechanism. Biophys. Struct. Mech. 9:35-60.
- Meves, H. y Chandler, W.K. 1965. Ion selectivity in perfused giant axons. J. Gen. Physiol. 48:31-33.
- Meves, H. y Nagy, K. 1989. Multiple conductance states of sodium channel and of other ion channels. Biochim. Biophys. Acta. 988:99-105.

- Miller, C. 1982. Open-state substructure of single chloride channel from *Torpedo electroplax*. Phil. Trans. Roy. Soc. B. 299:401-411.
- Miller, C. y Racker, E. 1976. Ca^{++} -Induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial bilayers. J. Memb. Biol. 30:283.
- Miller, C., Latorre, R. y Reisin, I. 1987. Coupling of voltage-dependent gating and Ba^{++} block in the high-conductance Ca^{++} -activated K^+ channel. J. Gen. Physiol. 90:427-449.
- Miller, C. 1986 ION CHANNEL RECONSTITUTION (Editor). Plenum press, New York.
- Miller, J., Agnew, W. y Levinson, S. 1983. Principal glycopeptide of the tetrodotoxin saxitoxin binding protein from *Electrophorus electricus*: Isolation and partial chemical and physical characterization. Biochemistry 22:462-470.
- Moczydlowski E. y Latorre, R. 1983a. Saxitoxin and ouabain activity of isolated skeletal muscle membrane as indicator of surface origin and purity. Biochem. Biophys. Acta.
- Moczydlowski E. y Latorre, R. 1983b. Gating kinetics of Ca^{++} activated K^+ channel from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers. Evidence of two voltage-dependent Ca^{++} binding reaction. J. Gen. Physiol. 82: 511-542.
- Moczydlowski E., Garber S., Miller C. 1984a. Batrachotoxin-activated sodium channels in planar lipid bilayers: competition of tetrodotoxin block by Na. J. Gen. Physiol. 84: 665-686.
- Moczydlowski E., Hall S., Garber S., Strichartz G., Miller C. 1984b. Voltage-dependent blockade of muscle sodium channels by guanidinium toxins: Effect of toxin charge. J. Gen. Physiol. 84:687-704.
- Moczydlowski, E., Alvarez, O., Vergara, C. y Latorre, R. 1985. Effect of phospholipid charge on the conductance and gating of a Ca^{++} -activated K^+ channel in planar bilayers. J. Memb. Biol. 83:273-282.
- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, P. 1965. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12:88-118.
- Montal, M., Labarca, P., Fredkin, D., Suarez-Isla, B. y Lindstrom, J. 1984. Channel properties of the purified acetylcholine receptor from *Torpedo californica* reconstituted in planar lipid bilayer membranes. Biophys. J. 45:165-174.
- Mueller, P., Rudin, D., Tsien, H. y Wescott, W. 1963. Method for the formation of single bimolecular membrane in aqueous solutions. J. Phys. Chem. 67:534-535.
- Narahashi, T., Albuquerque, E. y Deguchi, T. 1971. Effects of batrachotoxin on membrane potential and conductance of squid giant axon. J. Gen. Physiol. 58:54-70.
- Neher, E. y Steinbach, J. 1978. Local anaesthetics transiently blocks currents through single acetylcholine receptor channels. J. Physiol. 277:153-176.
- Nilius, B., Vereecke, J. y Carmeliet, E. 1989a. Properties of bursting Na channel in the presence of DPI 201-106 in guinea-pig ventricular myocytes. Pflugers Arch. 413:234-241.
- Nilius, B., Vereecke, J. y Carmeliet, E. 1989b. Different conductance states of the bursting Na channel in guinea-pig ventricular myocytes. Pflugers Arch. 413:242-248.

- Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino S., Kangawa K., Matono H., Raftery M., Hirose I., Inayama S., Hayashida H., Mayota T., Numa S. 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature (Lond.)* 312: 121-127.
- Numa, S., Noda, M. 1986. Molecular structure of sodium channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 479: 338-355.
- Olivarez, E. 1989. Efecto de la batracotoxina y la toxina TyTx-gama sobre las corrientes de sodio del músculo esquelético de rana. Tesis de Magister en Biología. U. de Chile.
- Patlak, J. 1988. Sodium channel subconductance levels measured with a new variance-mean analysis. *J. Gen. Physiol.* 92:413-430.
- Press, W., Flannely, B., Teukolsky, S. y Vetterling, W. 1986. Numerical recipes. The art of scientific computing. Cambridge University Press. N.Y.
- Quandt, F. y Narahashi, T. 1982. Modification of single Na⁺ channels by batrachotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:6732-6736.
- Rao, C. R. 1973. Linear statistical inference and its applications. Segunda edición. Jhon Wiley & Sons, N.Y. 625 pp.
- Recio-Pinto, E., Duch, D.S., Levinson, S.R. y Urban, B.W. 1987. Purified and unpurified sodium channels from the eel electroplax in planar lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* 90:375-395.
- Richards, E. y Miller, C. 1990. Steady-state coupling of ion-channel conformations to a transmembrane ion gradient. *Science.* 247:1208-1210.
- Robinson, K.R. y Stokes, R.H. 1965. Electrolyte solutions. Butterworths, Lond.
- Rojas, E y Luxoro, M. 1963 Microinjection of trypsin into axons of squid. *Nature (Lond.)* 199:78-79.
- Roseblatt M., Hidalgo C., Vergara C., Ikemoto N. 1981. Immunological and biochemical properties of transverse tubular membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 256:8140-8148.
- Roux, B. y Sauvé, R. 1985. A general solution to the time interval omission problem applied to single channel analysis. *Biophys. J.* 48:149-158.
- Sackmann, B. y Neher, E. 1983. ION CHANNEL RECORDING (Editores). Plenum press, New York.
- Scanley, B.E., Hank, D.A., Chay, T. y Fozzard, H.A. 1989. Kinetic analysis of single sodium channels from canine cardiac purkinje cells. *J. Gen. Physiol.* 95:411-437.
- Schindler, H. 1990. Experimental strategies to investigate the structural basis of regular subconductance patterns observed for several ion channels. *Biophys. J.* 57:395a (Abstr.).
- Schreibmayer, W., Tritthart, H., y Schindler, H. 1989. The cardiac sodium channel shows a regular substates pattern indicating synchronized activity of several ion pathways instead of one. *Biochim. Biophys. Acta.* 988:99-105.
- Schreibmayer, W. 1990. Substate analysis of the cardiac sodium channel. *Biophys. J.* 57:395a (Abstr.).

- Sigworth, F.J. y Neher, E. 1980. Single Na⁺ channel current observed in cultured rat muscle cells, *Nature (Lond.)* 287:447-449.
- Sigworth, F. y Sine, M. 1987. Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys. J.* 52:1047-1054.
- Smith, J., Coronado, R. y Meissner, G. 1985. Sarcoplasmic reticulum contains adenin nucleotide activated calcium channel. *Nature.* 316:446-449.
- Smith-Maxwell C. y Begenisich, T. 1987. Guanidinium analogues as probes of the squid axon sodium pore. Evidence for internal surface charges. *J. Gen. Physiol.* 90:361-374.
- Stevens, C. 1987. Molecular Neurobiology: Channel families in the brain. *Nature* 328:198-199.
- Strichartz, G.R. 1973. Inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. *J. Gen. Physiol.* 62:37-57.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, M., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H. y Numa, S. 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of sodium channels. *Nature.* 339:597-603.
- Suarez-Isla, B., Irribarra, V., Oberhauser, A., Larralde, L., Bull, R., Hidalgo, C. y Jaimovich, E. 1988. Inositol (1,4,5)-trisphosphate activates a calcium channel in isolated sarcoplasmic reticulum membranes. *Bioph. J.* 54:737-741.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. y Numa, S. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature (Lond.)* 328:313-318.
- Tanguy, J. y Yeh, J.Z. 1988. Batrachotoxin uncouples gating charge immobilization from fast Na inactivation in giant axons. *Biophys. J.* 54:719-730.
- Tanguy, J., Yeh, J.Z. y Narahashi, T. 1984. Interaction of batrachotoxin with sodium channels in squid axons. *Biophys. J.* 45:184a. (Abstr.)
- Tank, D. y Miller, C. 1983. Patch clamped liposomes: Recording reconstituted ion channels. En: SINGLE CHANNEL RECORDING (Editores. B. Sackman y E. Neher). Plenum press, New York. pp. 91-105.
- Tempel, B., Papazian, M., Schwarz, T., Jan, Y. y Jan, L. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science* 237:770-774.
- Thornhill, W. y Levinson, R. 1987. Biosynthesis of electroplax sodium channels in eel electrocytes and *Xenopus* oocytes. *Biochemistry* 26:4381-4388.
- Trimmer, J., Coopermann, S., Tomiko, S., Zhou, J., Crean, S., Boyle M., Kallen, R., Sheng, Z., Barchi, R., Sigworth, F., Goodman, H., Agnew, W. y Mandel, G. 1989. *Neuron.* 3:33-49.
- Vandenberg, C.A. y Horn, R. 1984. Inactivation viewed through single sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 84:535-564.
- Vergara, C. 1983. Characterization of a Ca²⁺-activated K⁺ channel from skeletal muscle membranes in artificial bilayers. Tesis de doctorado, Harvard University, Cambridge, MA.

- Villarroel, A. 1989. Mechanism of ion conduction in the large calcium activated potassium channel. Tesis de doctorado, U.C.L.A. USA.
- Villarroel, A., Alvarez, O. y Eisenman, G. 1991. The current-voltage behavior of K^+ in the large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channel. Para ser enviado a publicación.
- Weiss, R. y Horn, R. 1986. Functional differences between two class of sodium channels in developing rat skeletal muscle. *Science* 233:361-364.
- Worley, J., French, R. y Krueger, B. 1986. Trimethyloxonium modification of single batrchotoxin-activated sodium channels in planar bilayers: Changes in unit conductance and in block by saxitoxin and calcium. *J. Gen. Physiol.* 87: 327-349.
- Woodhull, A. 1973. Ion blockade of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 61: 687-708.
- Yellen, G. 1984a. Ionic permeation and blockade in Ca^+ -activated K^+ channels of bovine chromaffin cells. *J. Gen. Physiol.* 84: 157-186.
- Yellen, G. 1984b. Relief of Na^+ block of Ca^{++} -activated K^+ channels by external cations. *J. Gen. Physiol.* 84: 187-199.
- Yue, D., Lawrence, J. y Marban, E. 1989. Two molecular transitions influence cardiac sodium channel gating. *Science*, 244:349-352.